

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



TESIS DOCTORAL

**Estudio del efecto de la reducción del contenido de sales nitrificantes
en la calidad microbiológica y aroma de los embutidos crudos curados**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Xavier Fernández Hospital

Directoras

**Manuela Fernández Álvarez
Eva Hierro Paredes**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA REDUCCIÓN DEL
CONTENIDO DE SALES NITRIFICANTES EN LA
CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y AROMA DE LOS
EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS

TESIS DOCTORAL

Xavier Fernández Hospital

Dirigida por:
Manuela Fernández Álvarez
Eva Hierro Paredes

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA REDUCCIÓN DEL
CONTENIDO DE SALES NITRIFICANTES EN LA
CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y AROMA DE LOS
EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS

TESIS DOCTORAL

Xavier Fernández Hospital

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA REDUCCIÓN DEL
CONTENIDO DE SALES NITRIFICANTES EN LA
CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y AROMA DE LOS
EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención
honorífica de “Doctor Europeo”, presenta el Licenciado y
Máster Xavier Fernández Hospital

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de
los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 37 49 Fax: 91 394 37 43

Manuela Fernández Álvarez y Eva Hierro Paredes, Profesoras Titulares de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio del efecto de la reducción del contenido de sales nitrificantes en la calidad microbiológica y aroma de los embutidos crudos curados”, de la que es autor D. Xavier Fernández Hospital, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos bajo la dirección conjunta de las abajo firmantes, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 20 de octubre de 2015

Manuela Fernández Álvarez

Eva Hierro Paredes



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El trabajo ha sido financiado por el proyecto "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" (CARNISENUSA), del Programa Consolidar-Ingenio 2010 (CSD 2007-00016), del Ministerio de Educación y Ciencia.

D. Xavier Fernández Hospital ha sido beneficiario de un contrato de investigación asociado a dicho proyecto y de una beca del Programa Predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid.

A mis padres
A mis abuelos

Als meus pares
Als meus avis

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración de un numeroso grupo de personas, y por ello me gustaría agradecerse a todos aquellos que han contribuido de alguna u otra forma:

En primer lugar a mis directoras, las Profesoras Manuela Fernández Álvarez y Eva Hierro Paredes, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por haber confiado en mí, pero sobre todo por el trato tan bueno recibido durante todos estos años.

A Lorenzo de la Hoz, que en paz descanse, y M^a Dolores Selgas, directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante el período de realización de este trabajo de investigación, por acogerme en el departamento y por su amabilidad.

A todos los profesores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos: Billy, Gonzalo, Marisa, Leo, Isabel Cambero, Carmen San José, Carmen Herranz, María Marín, Juan Miguel, etc., por haberme ayudado siempre que lo he necesitado y por su trato tan próximo.

A toda la gente que he conocido gracias al Proyecto Consolider, en especial a Jacint Arnau, Marta Gratacós, Pedro Roncalés y Alberto Lorés, por hacer que mis visitas a Monells y Zaragoza para los muestreos fueran muy agradables. Y a Pepe Carballo, al que siempre ha sido un placer recibir en el departamento cada vez que venía a recoger sus muestras.

Al Profesor Mike Peck y a la Dra. Sandra Stringer, por darme la oportunidad de trabajar con ellos en el IFR, y de conocer a tan buena gente (Jason, Martin, Dunkan, Andy, Susie, June y Maggie). A Izaskun y Joaquín, porque sin vosotros mi etapa en Norwich no habría sido tan genial.

A Aurora por su ayuda en los asuntos burocráticos y a Alberto por echarme un cable siempre que algún equipo se me resistía.

A todos mis compañeros de laboratorio. A las que aún están, Belén, Carmen H. y Laura, y a las que ya se fueron, María, Elvira y Susana, por las buenas conversaciones compartidas, pero sobre todo por los buenos ratos pasados tanto dentro como fuera del laboratorio. A Serena y Nádia, que aunque estuvieron poco tiempo, su simpatía y energía las hace inolvidables.

Al resto de mis compañeros del Departamento, Raquel, Concha, Lola, Carlos, Rosa, Karen, Ana Belén, Esther y, en general, a todo el grupo de Juan Miguel, por estar siempre dispuestos a ayudarme en lo que he necesitado. A Carmen Gámez, Irene Galán, Irene García y a Juan Aguirre, mis primeras amistades en el Departamento, y a las que se echa tanto de menos.

A Ana Rivas, por su ayuda en el aprendizaje del análisis de cromatogramas, siempre con humor.

A mis amigos que dejé en Barcelona y Brasil pero a quienes siempre tengo muy presentes, Bàrbara A., Bàrbara S., Hugo y Fábio.

Pero sobre todo, a mi familia. A mis padres, por haber sido tan buenos conmigo y haberme apoyado en todo momento. A Oriol y Núria, por haberme hecho tío del mejor sobrino del mundo, Arnau, y a mis abuelos, por ser tan especiales y que, aunque mi abuela no pudo ver finalizada esta tesis, seguro que ahora mismo está chuleando de nieto pianista y, además, Doctor. A ti, Juan Carlos, por hacerme feliz.

ÍNDICE

Resumen / Abstract	1
I. Antecedentes bibliográficos	11
1. Origen de los productos curados	13
2. Definición, clasificación y elaboración de productos curados	14
2.1. Los productos cárnicos crudos curados	14
2.2. Proceso de elaboración de los embutidos crudos curados	15
2.2.1. <i>Preparación y mezcla de los ingredientes</i>	16
2.2.2. <i>Fermentación</i>	17
2.2.3. <i>Maduración o secado</i>	18
2.3. Empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de embutidos	19
2.3.1. <i>Bacterias ácido lácticas</i>	19
2.3.2. <i>Cocos Gram-positivos catalasa-positivos</i>	21
2.3.3. <i>Mohos y levaduras</i>	22
2.4. Microorganismos patógenos de interés en los embutidos	23
2.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.4.2. <i>Salmonella</i> spp.	25
2.4.3. <i>Clostridium botulinum</i>	27
3. Sales de curado	32
3.1. Química de los nitratos y nitritos	32
3.2. Funciones de los nitratos y nitritos	35
3.2.1. <i>Efecto en el color</i>	35
3.2.2. <i>Efecto en el sabor y aroma</i>	37
3.2.3. <i>Actividad antioxidante</i>	38
3.2.4. <i>Actividad antimicrobiana</i>	39
3.3. Efecto de los nitratos y nitritos en la salud humana	42
3.3.1. <i>Formación de N-nitrosaminas</i>	44
3.3.2. <i>Metahemoglobinemia</i>	48

3.4. Alternativas al uso de sales nitrificantes	49
4. Aspectos legales del uso de nitratos y nitritos en los productos cárnicos curados	50
5. Referencias	56
II. Justificación y objetivos	69
III. Plan de trabajo	73
IV. Resultados	79
 Artículo 1. Survival of <i>Listeria innocua</i> in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite	 81
Artículo 2. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of <i>Salmonella</i> Typhimurium	105
Artículo 3. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile	125
Artículo 4. A study on the toxigenesis by <i>Clostridium botulinum</i> in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages	147
V. Discusión general.....	167
VI. Conclusiones / Conclusions	181

Resumen / Abstract

Resumen

Entre las diferentes técnicas que se utilizan para la conservación de la carne se encuentra el curado, método tradicional basado en el empleo de cloruro sódico conjuntamente con sales nitrificantes (nitratos y/o nitritos). Estos compuestos ejercen un importante papel como antimicrobianos y antioxidantes, y participan en la formación del color y aroma típicos de los productos curados.

A pesar de todos estos efectos beneficiosos, las sales nitrificantes pueden ser precursoras de la formación de nitrosaminas, compuestos con actividad carcinogénica, teratogénica y mutagénica demostrada. Por este motivo, en los últimos años se ha planteado la posibilidad de reducir la presencia de nitratos y nitritos o incluso evitar su utilización en los productos cárnicos. Para ello es necesario llevar a cabo estudios rigurosos sobre el impacto real de la concentración de nitrificantes en estos productos, a fin de evaluar la posibilidad de disminuir las cantidades permitidas, sin que ello afecte a su seguridad y calidad sensorial.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, esta Tesis Doctoral se planteó como objetivo evaluar el efecto de la reducción de la concentración de nitrato y nitrito (hasta en un 50% de la cantidad máxima permitida actualmente) en la evolución de la microbiota habitual de los embutidos crudos curados y en el control de los principales microorganismos patógenos asociados a su consumo, así como en el perfil de compuestos volátiles responsables de su aroma.

En el transcurso de estas investigaciones se elaboraron distintos tipos de embutidos mediterráneos (chorizo, salchichón y fuet) con diferentes cantidades de sales nitrificantes: 150 mg/kg de nitrato y de nitrito (cantidad máxima que permite la legislación europea), dos reducciones del 25 y el 50%, respectivamente, y ausencia de nitrificantes (control). Se analizó la microbiota típica mediante recuentos de bacterias lácticas y cocos Gram-positivos catalasa-positivos (CGC+), además de enterobacterias. También se analizó el pH, la a_w y el extracto seco, como parámetros físico-químicos de interés tecnológico. Para los estudios relativos al control de patógenos se realizaron ensayos de inoculación (*challenge tests*) de *Listeria innocua* (como subrogado de *Listeria monocytogenes*) y *Salmonella* Typhimurium en salchichón

y de *Clostridium botulinum* en salchichón y fuet. La supervivencia de *Listeria* y *Salmonella* se determinó mediante recuentos en placa, mientras que la producción de toxina botulínica se evaluó por ELISA. El estudio del perfil de compuestos volátiles se llevó a cabo al final de la maduración mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El patrón de desarrollo de las bacterias lácticas a lo largo del proceso de maduración de los embutidos no se vio afectado por la concentración de nitrato/nitrito. Consecuentemente, la fermentación de los productos se llevó a cabo correctamente. Por el contrario, la concentración de sales nitrificantes sí afectó a los CGC+, observándose mayores recuentos en los lotes con menor concentración de nitrato/nitrito (50% de reducción y control). Estos microorganismos participan en el correcto desarrollo del color y el aroma de los embutidos y el comportamiento observado se relacionó directamente con el contenido de compuestos volátiles. Así, los embutidos con mayores recuentos de CGC+ presentaron una mayor concentración de compuestos derivados de la fermentación de los carbohidratos y de la degradación de los aminoácidos. Por otra parte, la concentración de nitratos y nitritos también afectó a las enterobacterias, que en ausencia de estos aditivos presentaron mayores recuentos al final de la maduración.

En relación con los ensayos de inoculación, se observó un aumento de los recuentos finales de *Salmonella* Typhimurium al eliminar los nitratos y nitritos de la formulación. Con respecto a *Listeria*, mientras que la ausencia de nitrato/nitrito permitió su multiplicación en la masa recién embutida, la presencia de sales nitrificantes produjo la inhibición de su crecimiento ya desde el comienzo del proceso. Aún así, los embutidos con 150 mg/kg de nitrato y de nitrito presentaron recuentos aproximadamente 1,5 log ufc/g inferiores a los elaborados con un contenido reducido (25 y 50%). Por último, no se detectó producción de toxina botulínica ni en salchichón ni en fuet, incluso cuando los productos se elaboraron sin nitrato/nitrito añadido.

En relación con el perfil de compuestos volátiles, además del mencionado incremento de los compuestos derivados de la fermentación de los carbohidratos y del catabolismo microbiano de los aminoácidos (relacionado con los recuentos de los CGC+), se observó un efecto directo de la concentración de nitratos y nitritos en los

niveles de compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica. Estos compuestos sufrieron un incremento en ausencia de sales nitrificantes, mientras que una reducción de hasta el 50% no afectó a la oxidación lipídica.

En conclusión, la disminución de la concentración de nitratos y nitritos no sólo afectaría a la microbiota típica de los embutidos crudos curados, con mayores recuentos de CGC+ y de enterobacterias, sino también a su perfil de compuestos volátiles. La reducción de las cantidades máximas actualmente permitidas por la Unión Europea también podría comprometer la seguridad de los embutidos crudos curados, sobre todo con respecto a *Listeria*. Si bien es cierto que en este trabajo no se detectó la producción de toxina por *C. botulinum*, teniendo en cuenta las anteriores observaciones, el uso de nitrito en la industria cárnica podría ofrecer ventajas desde el punto de vista higiénico que deberían analizarse en el contexto de un estudio del balance riesgo-beneficio en contraposición con sus posibles efectos toxicológicos.

Abstract

Curing is a traditional method for meat preservation based on the use of sodium chloride together with nitrifying salts (nitrate and/or nitrite). These compounds exert an important antioxidant and antimicrobial activity, and contribute to the typical colour and flavour of cured products.

Despite their beneficial role, nitrate and nitrite may be precursors to the formation of nitrosamines, which carcinogenic, teratogenic and mutagenic activities are well known. For this reason, over the last years the reduction in its use, or even its elimination, have been proposed. This decision should be based on rigorous studies about the impact of reducing the concentration of nitrate and nitrite in the microbial safety and sensory quality of cured meat products.

Considering these premises, the objectives of this PhD Thesis were to evaluate the effect of using reduced concentrations of nitrate and nitrite (up to 50% of the maximum levels currently allowed) on the typical microbiota of dry fermented sausages, on the growth of some relevant pathogens associated with the consumption of these products, and on the volatile profile that characterizes their flavour. For this purpose, different types of Mediterranean dry fermented sausages (*chorizo*, *salchichón* and *fuet*) were manufactured with different concentrations of nitrifying salts: 150 mg/kg of both nitrate and nitrite (maximum level allowed by the current European regulations), and a 25% and 50% reductions. Sausages with no nitrate/nitrite (control) were also prepared. For the study of the typical microbiota, lactic acid bacteria, Gram-positive catalase-positive cocci (GCC+) and *Enterobacteriaceae* were enumerated. Physico-chemical parameters, such as pH, a_w and moisture content were also analysed due to their technological implications. Challenge tests were conducted to assess the influence of nitrite on the growth of pathogens. *Listeria innocua* (as a surrogate for *Listeria monocytogenes*) and *Salmonella* Typhimurium were inoculated in *salchichón* and *Clostridium botulinum* was assessed in *salchichón* and *fuet*. *Listeria* and *Salmonella* numbers were obtained by plate counting, while *C. botulinum* was tested for the production of neurotoxin by

ELISA. The study of the volatile profile was performed at the end of ripening by gas chromatography-mass spectrometry.

The counts of lactic acid bacteria along ripening were not affected by the concentration of nitrate/nitrite, which revealed an adequate fermentation. On the contrary, the concentration of nitrifying salts affected the growth pattern of GCC+, with higher counts in the batches with lower nitrate/nitrite content (50% reduction and control). These microorganisms are involved in the development of color and aroma of dry fermented sausages and thus, the behavior observed was directly related to the volatile profile. The sausages with higher GCC+ counts showed higher concentration of compounds derived from carbohydrate fermentation and amino acid degradation. *Enterobacteriaceae* were also affected by the concentration of nitrate and nitrite, with higher numbers in the final product when it was elaborated without these additives.

Regarding the challenge tests, an increase in the final counts of *Salmonella* Typhimurium was observed when nitrate and nitrite were completely removed from the formulation. With respect to *Listeria*, while the absence of nitrate/nitrite allowed its growth at the beginning of the process, the presence of nitrifying salts inhibited its growth. However, the sausages added with 150 mg/kg of nitrate and nitrite showed approximately 1.5 log cfu/g lower counts than those reduced by 25% and 50%. Finally, no botulinum neurotoxin was detected in *salchichón* nor in *fuet*, even when sausages were produced without nitrate/nitrite.

In relation to the volatile profile, besides the above referred increase of compounds derived from carbohydrate fermentation and from microbial amino acid catabolism (related with the GCC+ counts), nitrate/nitrite concentration showed a direct effect on the levels of volatiles from lipid oxidation. While these compounds increased in the absence of nitrifying salts, a reduction of up to 50% did not affect the amount of these volatiles.

In conclusion, the decrease in the concentration of nitrate and nitrite would not only affect the typical microbiota of dry fermented sausages, with higher counts of GCC+ and *Enterobacteriaceae*, but also their volatile profile. The reduction of the maximum concentrations currently allowed by the European Union could compromise

the microbial safety of dry fermented sausages, especially regarding *Listeria*. Although no botulinum neurotoxin was detected, considering the above-mentioned observations, the use of nitrite in the meat industry could offer advantages from a safety point of view that should be analyzed in the context of a study of the risk-benefit balance as opposed to the possible toxicological effects.

I. Antecedentes bibliográficos

I. Antecedentes bibliográficos

1. Origen de los productos curados

La historia de los productos curados está estrechamente ligada al paso del hombre primitivo de cazador a recolector, acontecimiento que tuvo lugar alrededor del año 8.000-10.000 a.C. El consiguiente aprendizaje de las técnicas de cultivo y la domesticación de los animales propició el desarrollo de distintos métodos de conservación de los alimentos, permitiendo al ser humano disponer de víveres durante las épocas de escasez (Toldrá, 2002).

Uno de los primeros métodos de conservación fue el curado, técnica basada en la utilización conjunta de cloruro sódico y de sales nitrificantes (nitratos y nitritos). Aunque nuestros antepasados no conocían el fundamento de este método, empíricamente comprobaron que la adición de sal (principalmente sal marina o sal gema con impurezas de nitrato potásico) a la carne y el pescado permitía la obtención de piezas de larga conservación y de sabor y aroma agradables. Hay indicios de que hacia el año 2.000 a.C., la civilización sumeria, considerada entre las más antiguas del mundo, ya preparaba productos curados (Toldrá, 2002). En Europa, la producción y consumo de productos cárnicos crudos curados comenzó en el área mediterránea, por su climatología favorable para el secado y maduración de forma natural. En cambio, en las zonas frías del norte, donde el clima no permitía el secado natural, se aplicaba el ahumado para lograr la deshidratación de los alimentos. Fueron los romanos, gracias a la herencia recibida de los griegos, los que perfeccionaron las técnicas de curado y extendieron su producción por todo el Imperio (Vignolo *et al.*, 2010).

La elaboración de productos cárnicos curados se realizó de forma empírica durante siglos, desarrollándose en todo el mundo una enorme variedad de productos de larga vida útil y con diferentes características gustativas, aunque no fue hasta finales del siglo XIX cuando se comenzó a estudiar y comprender la química y microbiología del curado (Honikel, 2010; Toldrá, 2002). En la actualidad, esta técnica ha pasado a ser fundamentalmente un método de transformación que permite elaborar productos con un alto valor añadido al ser muy apreciados por sus propiedades organolépticas.

2. Definición, clasificación y elaboración de los productos curados

El término “curado” hace referencia a una gran variedad de productos basados en la adición de sales de curado (cloruro sódico y nitrato/nitrito), que se difunden en el producto hasta alcanzar todas sus partes, proporcionando un color y aroma característicos. Los productos cárnicos curados pueden clasificarse en función de si han sufrido tratamiento térmico o no (**Figura I.1**). Así:

- Los **productos cocidos** se basan en la inyección, la inmersión o la mezcla de la carne (en pieza entera, troceada o picada) con una salmuera, seguida de una cocción y, opcionalmente, ahumado. En este grupo encontramos, entre otros productos, el jamón cocido, la lengua cocida, la mortadela, el chópé y las salchichas tipo Frankfurt.
- Los **productos crudos curados** se elaboran mediante la adición de sales de curado bien en la superficie de la pieza entera, bien mezclándolas con la carne picada o bien sumergiendo la pieza en salmuera. Posteriormente se dejan madurar y secar durante un período que puede abarcar desde algunas semanas a varios meses o incluso años. Opcionalmente los productos pueden someterse a una operación de ahumado antes de la maduración. En este grupo cabe citar, entre otros, el jamón ibérico, el jamón de Parma, la cecina, el lacón, el lomo curado y los embutidos crudos curados.

2.1. Los productos cárnicos crudos curados

En España existe una gran tradición en la elaboración y consumo de productos cárnicos crudos curados. Según datos de la ANICE, en el año 2013 España fue el cuarto país de la Unión Europea (UE) en producción de elaborados cárnicos, con 1,31 millones de toneladas, de los cuales el 33,5% correspondió a jamón y embutidos curados. Además, la industria cárnica fue el primer sector exportador de la industria agroalimentaria española en ese año, con casi 139.000 toneladas de derivados cárnicos, de las cuales el 51.5% correspondió a productos crudos curados (ANICE, 2015).

El Real Decreto 474/2014, *por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos*, define los productos cárnicos crudos curados (también

denominados derivados cárnicos curado-madurados) como “*los productos sometidos a un proceso de salazón y de curado-maduración suficiente para conferirles las características organolépticas propias y de estabilidad a temperatura ambiente, que pueden someterse opcionalmente a ahumado*” (Ministerio de la Presidencia, 2014). Esta normativa clasifica estos productos según se obtengan de piezas cárnicas enteras (jamón curado) o carnes picadas (embutidos crudos curados).

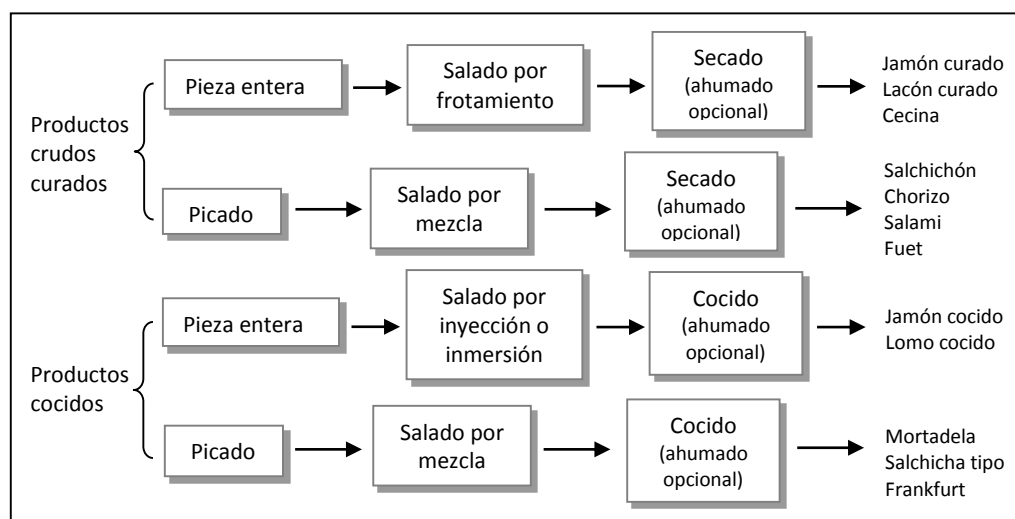


Figura I.1. Principales productos cárnicos curados. Adaptado de: Flores y Toldrá (1993).

2.2. Proceso de elaboración de los embutidos crudos curados

Aunque en España existen decenas de variedades de embutidos, en general durante la fabricación de todos ellos se distinguen tres etapas:

- Preparación y mezcla de los ingredientes
- Fermentación
- Maduración o secado

Durante las distintas etapas del proceso se suceden distintos fenómenos físicos, químicos y microbiológicos estrechamente interrelacionados y cuyo correcto desarrollo afectará a la calidad y seguridad del producto final.

2.2.1. Preparación y mezcla de los ingredientes

Esta etapa consiste en el picado de la carne y la grasa a bajas temperaturas (entre -5 y 0 °C) para que tengan la consistencia precisa y el corte resulte adecuado. A continuación se añade el resto de los ingredientes y se procede al amasado, operación que generalmente se realiza a vacío. Para favorecer la interacción entre los ingredientes y la ligazón de la pasta, ésta se deja en refrigeración durante 24-48 horas. En la **Tabla I.1** se muestra la fórmula típica de distintos tipos de embutidos crudos curados. El embutido de la masa se suele realizar a unos 0 °C en equipos a vacío para eliminar la mayor cantidad posible de oxígeno, ya que podría interferir en el desarrollo del color y sabor deseados.

Tabla I.1.

Formulación típica (g/100 g) de algunos embutidos crudos curados mediterráneos.

	Salchichón (ES/FR)	Salami (IT)	Fuet (ES)	Chorizo (ES, PT)	Lukanka (BU)	Salami (GR)
Carne magra de cerdo	35-70	45-84	60-70	65-90	25	76
Grasa de cerdo	10-25	14-25	30-40	20-40	20	24
Carne magra de vacuno	0-50	0-37	0-20	0-20	55	-
Azúcares fermentables ^a	0,2-0,5	0,3-0,7	0,1-0,4	0,6-0,8	-	1,5
Sales de curado ^b	2,0-2,4	1,8-2,5	2,0-2,4	1,8-2,1	2,24	2,6
Espicias:						
Pimienta negra	0-0,4	0-0,14	0-0,3	-	0,3	-
Pimienta blanca	-	0-0,2	-	0-0,3	-	-
Pimienta roja	-	-	-	-	0,2	-
Pimentón	-	-	-	2,5/0	-	-
Comino	-	-	-	-	0,2	-
Ajo	-	0-0,2	-	0,2-1,2	-	0,1
Mezcla pimienta/clavo	-	-	-	-	-	0,3
Otros: ^c						
Glutamato sódico	0,25	-	0-0,15	-	-	-
Leche en polvo	0-0,6	0-2,5	-	0-2,5	-	2,5
Caseinato	0-0,6	-	0-1,0	-	-	-
Vino	-	-	-	-	-	0,2
Humo líquido	-	-	-	-	0,2	-

ES, España; FR, Francia; IT, Italia; PT, Portugal; BU, Bulgaria; GR, Grecia.

^a Generalmente glucosa, aunque a veces glucosa conjuntamente con lactosa.

^b Las sales de curado comprenden NaCl, nitrato, nitrito y ácido ascórbico.

^c En algunos productos también pueden usarse colorantes, como rojo cochinilla, ponceau 4R, etc.

Adaptado de: Hierro *et al.* (2014).

La composición de la microbiota de la masa recién embutida depende de los ingredientes utilizados, especialmente la carne, la grasa y las tripas (Comi *et al.*, 2005; Lebert *et al.*, 2007), así como de las condiciones higiénicas en las que se realizan las operaciones de obtención y preparación de las materias primas. En general, cuando no se adicionan cultivos iniciadores, la microbiota de la masa es muy variada y similar a la que se puede encontrar en la carne fresca: bacterias ácido lácticas (BAL), *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* (conocidas en conjunto como cocos Gram-positivos catalasa-positivos, CGC+), *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, mohos y levaduras (Andritsos *et al.*, 2012; Drosinos *et al.*, 2005; Lebert *et al.*, 2007). Además, en condiciones higiénicas deficientes, también podrían encontrarse microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* o bacterias esporuladas procedentes de las especias (Chevallier *et al.*, 2006; Comi *et al.*, 2005; Samelis *et al.*, 1998; VLA/RIVM/Food-DTU, 2011). Debido a la adición de sal y azúcares, la actividad de agua (a_w) se reduce desde valores próximos a 0,99 en la carne fresca hasta 0,96-0,97 en la masa recién embutida. Estas nuevas condiciones seleccionarán la microbiota capaz de seguir multiplicándose en el producto.

2.2.2. Fermentación

Una vez embutida la masa, el producto se traslada a cámaras donde la temperatura, humedad relativa (HR) y velocidad del aire están controladas. En esta etapa los embutidos se mantienen a 18-26 °C y HR próxima al 90% durante 1-2 días, tiempo en el que tienen lugar dos procesos fundamentales para el desarrollo de las características de estos productos: el descenso del pH debido a la actividad metabólica de las BAL y la reducción de nitratos y nitritos por los CGC+.

El desarrollo de los microorganismos inicialmente presentes en los embutidos a lo largo del proceso va a depender de diversos factores, como la temperatura, la a_w , el pH, la tensión de oxígeno y los ingredientes adicionados, como azúcares y sales de curado. Durante los primeros momentos, antes de que tenga lugar la fermentación, el producto es más susceptible de sufrir alteraciones dado que su contenido acuoso y su pH aún son elevados. Así pues, durante este período la presencia de nitrito es esencial

por su efecto inhibidor del desarrollo de ciertos microorganismos no deseables, como *Pseudomonas* spp. y enterobacterias (Rowe *et al.* 1979).

Durante la fermentación, las BAL se convierten en la microbiota dominante del embutido, alcanzando recuentos del orden de 10^7 - 10^9 ufc/g. Estas bacterias fermentan los azúcares produciendo ácido láctico, que al acumularse ocasiona un descenso del pH. Asimismo, las micrococáceas alcanzan valores de 10^4 - 10^6 ufc/g, favorecidas por las condiciones ambientales antes de que tenga lugar la fermentación.

Las nuevas condiciones propiciadas por el crecimiento microbiano, como la disminución de la tensión de oxígeno y la acidificación del medio, junto con el descenso progresivo de la a_w (que continuará durante el secado) y la presencia de nitrito, son las responsables de la inhibición, no sólo de la microbiota alterante, sino también de patógenos como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Clostridium botulinum* (Lücke, 2000).

2.2.3. Maduración o secado

Durante esta fase se establece en la cámara una temperatura de 12-15°C y una HR progresivamente decreciente hasta un valor que depende del calibre del embutido, habitualmente 84-87%. Asimismo, es necesaria una correcta circulación del aire para conseguir un secado homogéneo. Las condiciones del secado, sobre todo en las fases iniciales, son críticas para evitar la formación de costra superficial, que constituye uno de los defectos de fabricación más frecuentes. La duración de esta etapa se prolonga durante semanas o meses dependiendo del tipo de producto.

En esta fase, el contenido de agua del embutido desciende hasta un 35% o incluso a valores inferiores, lo que supone una pérdida de peso de al menos un 20%. Además, en este período se produce la maduración, en la que tienen lugar distintas reacciones químicas y enzimáticas (catalizadas tanto por enzimas tisulares como microbianas) en las que se generan numerosos compuestos que participan en el sabor y aroma.

Durante la etapa de secado, si la HR del ambiente no es demasiado baja, puede aparecer en los embutidos sin ahumar o suavemente ahumados una microbiota superficial compuesta por mohos y levaduras. Estos microorganismos son muy

tolerantes a valores de pH y de a_w bajos; sin embargo, presentan grandes requerimientos de oxígeno, lo cual hace que se desarrollen sólo en la superficie del embutido (Geisen *et al.*, 1992).

2.3. Empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de embutidos

Los cultivos iniciadores son preparaciones de microorganismos que se añaden en la formulación de algunos productos cárnicos con el objetivo de lograr un mayor control del proceso fermentativo y el desarrollo del color y aroma típicos, para obtener productos estandarizados de mayor calidad sensorial e higiénica. Para ser utilizados como cultivos iniciadores, los microorganismos deben ser capaces de crecer en el producto cárnico en el que se inoculen, multiplicarse en condiciones de baja tensión de oxígeno y a las temperaturas utilizadas en el proceso, y tolerar la presencia de nitrito y de altas concentraciones de sal. Además, no deben ser patógenos ni producir antibióticos, aminas biógenas, sulfuro de hidrógeno o peróxido de hidrógeno (Lücke y Hechelmann, 1987).

La utilización de cultivos iniciadores en la industria cárnica se limita casi exclusivamente a los embutidos crudos curados, para los que se emplean BAL y CGC+, además de mohos y levaduras en aquellos embutidos en los que se desea el desarrollo de una flora superficial.

2.3.1. *Bacterias ácido lácticas*

El papel de las BAL, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, es la fermentación de los azúcares, con el consiguiente descenso del pH y la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes. Además, las proteínas musculares coagulan al descender el pH a valores cercanos a su punto isoeléctrico, disminuyendo su capacidad de retención de agua. Todo ello contribuye a la firmeza y cohesión típicas del producto. El género *Lactobacillus* incluye más de 150 especies diferentes con una gran variedad de rasgos fenotípicos, bioquímicos y fisiológicos (Axelsson, 2004), si bien en los productos cárnicos se usan como cultivos iniciadores un número reducido de especies, principalmente *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus curvatus*. Estas bacterias fermentan los azúcares a ácidos

orgánicos a través de dos vías: la ruta de Embden-Meyerhof o vía glicolítica, que transforma 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico (fermentación homoláctica), y la ruta de los fosfatos de pentosa en la que, a partir de 1 mol de hexosa se produce 1 mol de ácido láctico, 1 mol de CO₂ y 1 mol de etanol o ácido acético (fermentación heteroláctica) (Kandler y Weiss, 1989; Kandler, 1983). Además, aunque en general las BAL son catalasa-negativas, algunas especies, como *L. sakei* y *L. plantarum*, codifican enzimas con actividad catalasa que promueven la destrucción de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (An *et al.*, 2010; Barynin *et al.*, 2001), previniendo así la decoloración y la oxidación lipídica.

L. sakei está plenamente adaptado a la fermentación de los productos cárnicos y es la especie predominante en los que se fermentan naturalmente (Chaillou *et al.*, 2005), motivo por el cual su uso como cultivo iniciador está muy extendido (Leroy *et al.*, 2006). *L. plantarum* es un microorganismo muy versátil que frecuentemente se encuentra en una gran variedad de ambientes diferentes, como fermentos vegetales y lácteos, o formando parte de la microbiota de la carne. A pesar de ello, no está específicamente adaptado a la carne como *L. sakei*. Finalmente, *L. curvatus* también se aísla de los productos cárnicos fermentados y tiene la capacidad de producir péptidos antimicrobianos que ayudan a controlar a los microorganismos indeseables (Cocconcelli y Fontana, 2010).

El género *Pediococcus* incluye 12 especies (De Bruyne *et al.*, 2008), de las cuales únicamente *Pediococcus pentosaceus* se usa como cultivo iniciador en los productos cárnicos fermentados. Los pediococos son bacterias homofermentativas cuya temperatura óptima de crecimiento, 28-32 °C, es superior a la de los lactobacilos (Axelsson, 2004). Su uso como cultivo iniciador está muy generalizado en los EE.UU. dada su rápida fermentación, lo que produce un rápido descenso del pH. En Europa, *P. pentosaceus* raramente se utiliza como cultivo iniciador en los productos cárnicos, aunque se puede encontrar de forma natural en bajas concentraciones (Papamanoli *et al.*, 2003).

Al igual que los CGC+, las BAL pueden presentar actividad nitrato/nitrito reductasa, como ocurre en *L. plantarum*, *L. sakei* y *P. pentosaceus* (Wolf *et al.*, 1990), si bien por distintas vías metabólicas. Así pues, mientras que *L. plantarum* y *P.*

pentosaceus forman amonio a partir del nitrito en un proceso hemo-dependiente que recibe el nombre de amonificación, *L. sakei* realiza un proceso de desnitrificación hemo-independiente, en el que se forman óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O) como intermediarios (Hammes, 2012).

2.3.2. Cocos Gram-positivos catalasa-positivos

En este grupo se incluyen distintas especies de microorganismos que pertenecen a las familias *Staphylococcaceae* y *Micrococcaceae*, y que se pueden utilizar como cultivos iniciadores por su capacidad de reducir el nitrato a nitrito.

El género *Staphylococcus* comprende más de 40 especies y subespecies (Ghebremedhin *et al.*, 2008). Algunas de ellas, principalmente estafilococos coagulasa-negativos como *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus equorum* y *Staphylococcus saprophyticus*, se encuentran frecuentemente y de forma natural en los embutidos fermentados, contribuyendo, por su actividad nitrato reductasa, al desarrollo y estabilidad del color rojo deseado en estos productos (Miralles *et al.*, 1996). Paralelamente, estos microorganismos intervienen en el desarrollo de las propiedades organolépticas, como la textura o el flavor por su actividad lipolítica y por su capacidad para degradar aminoácidos libres (Hammes y Hertel, 1998). La presencia de distintas especies de *Staphylococcus* spp. en los productos fermentados permite modular su aroma (Berdagué *et al.*, 1993; Søndergaard y Stahnke, 2002; Stahnke, 1995; Tjener *et al.*, 2004). Finalmente, gracias a su actividad catalasa los estafilococos degradan el peróxido de hidrógeno, inhibiendo la aparición de decoloraciones y reacciones oxidativas causantes de olores desagradables (Hammes y Knauf, 1994).

Los estafilococos son anaerobios facultativos capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de sal (hasta un 10%). No obstante, pese a estas características, se desarrollan lentamente en los productos cárnicos. Además, resultan rápidamente inhibidos por las BAL y el descenso de pH en los productos fermentados. Por todo ello, cuando se utilizan como iniciadores hay que añadirlos en cantidad suficiente para que puedan ejercer adecuadamente su función, del orden de 10⁶-10⁷ ufc/g (Hammes *et al.*, 1985).

S. xylosus y *S. carnosus* son los CGC+ más comúnmente utilizados como cultivos iniciadores por su mejor competitividad en la fermentación cárnica (Coconcelli y Fontana, 2010). Además, no presentan factores de virulencia en su genoma, pese a que comparten un 53-55%, en el caso de *S. xylosus* (Tan *et al.*, 2014), y un 46-50%, en el caso de *S. carnosus* (Rosenstein y Götz, 2010), del cromosoma con otros *Staphylococcus* patógenos, como *S. aureus* o *Staphylococcus epidermidis*.

Los estafilococos son capaces de metabolizar distintos azúcares. En condiciones anaeróbicas producen ácido láctico, además de acetato, piruvato y acetoína. En estas mismas condiciones, los estafilococos pueden utilizar tanto nitrato como nitrito como aceptor final de electrones en la respiración (Hartmann *et al.*, 1995). En primer lugar reducen el nitrato a nitrito, que se acumula en el medio y, únicamente cuando el nitrato se agota, empiezan a reducir el nitrito a amonio. Gracias a la reducción del nitrato a nitrito por los CGC+, junto con las condiciones de acidez establecidas por las BAL y/o por el uso de agentes reductores, como el ascorbato o el eritorbato, se forman los compuestos que participan en el curado, como el NO, cuya química se detalla más adelante.

También forman parte del grupo de CGC+ los géneros *Micrococcus* y *Kocuria*, que se encuentran presentes de forma natural en los productos cárnicos curados. Estos microorganismos también se pueden utilizar como iniciadores por su actividad nitrato reductasa aunque por sus características de crecimiento y su actividad enzimática se utilizan más los estafilococos (Núñez, 2014).

2.3.3. Mohos y levaduras

Los mohos y las levaduras colonizan típicamente la superficie de algunos productos madurados, como es el caso de ciertos embutidos mediterráneos, salvo que se inhiba su crecimiento por la aplicación del ahumado o por el uso de conservadores como los sorbato. La cobertura superficial de mohos y levaduras proporciona un aspecto, color, olor y sabor atractivos, ya que reduce los procesos oxidativos al consumir oxígeno superficial, metaboliza los peróxidos y ofrece protección frente a la luz; además evita el desarrollo de mohos productores de micotoxinas y antibióticos (Hierro *et al.*, 2014).

La mayoría de los cultivos iniciadores fúngicos utilizados en la industria cárnica pertenecen a especies del género *Penicillium*, sobre todo *Penicillium nalgiovense*, cuya principal ventaja es su fácil implantación en la superficie de los embutidos y su aspecto atractivo (Fink-Gremmels *et al.*, 1988). Por su parte, las levaduras, debido a su elevada demanda de oxígeno, pueden mejorar localmente el color mediante el mantenimiento de las condiciones anaeróbicas que se requieren para la reducción eficaz del nitrato (Lücke y Hechelmann, 1987). En general, la principal especie de levadura empleada como cultivo iniciador es *Debaryomyces hansenii*, que tolera altas concentraciones de sal, no es fermentativa y no posee actividad nitrato reductasa (Nakase y Suzuki, 1985).

2.4. Microorganismos patógenos de interés en los embutidos

Entre otros microorganismos, cabe destacar la importancia, en relación con la seguridad alimentaria, de *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *C. botulinum*.

2.4.1. *Listeria monocytogenes*

Entre las distintas especies que se incluyen en el género *Listeria*, únicamente *Listeria ivanovii* y *L. monocytogenes* son patógenas para el ser humano, siendo esta última la responsable de la mayor parte de los casos de listeriosis (Guillet *et al.*, 2010).

L. monocytogenes es un bacilo Gram-positivo, anaerobio facultativo, no formador de esporas y móvil a 25 °C (aunque no a 37 °C), gracias a la presencia de flagelos peritricos (Farber y Peterkin, 2000). Es capaz de crecer en un amplio intervalo de temperaturas (-1,5 a 45 °C) y de pH (4,2 a 9,5), aunque su temperatura y pH óptimos de crecimiento se sitúan en 30-37 °C y 7, respectivamente. Además, para poder multiplicarse requiere una a_w mínima de 0,92, tolerando hasta un 12% de sal (EURL-Lm, 2014). Todas estas características hacen de *L. monocytogenes* un microorganismo resistente y ubicuo. Se estima que alrededor de un 10-30% de animales y un 3-11% de seres humanos son portadores de este microorganismo en el intestino. Además, la presencia de *L. monocytogenes* en instalaciones, utensilios y personal manipulador, junto a su capacidad de sobrevivir en biofilms, puede propiciar la contaminación cruzada de los alimentos durante su procesado (Mørretrø y Langsrud, 2004).

La listeriosis es una enfermedad relativamente poco frecuente pero grave, por sus altos índices de hospitalización y mortalidad (91,6% y 17,8%, respectivamente), que se transmite principalmente por vía alimentaria (EFSA, 2014). El riesgo de listeriosis es mayor en mujeres embarazadas, neonatos, personas inmunodeprimidas y ancianos. En general, se considera que la dosis infectiva es de 10^3 ufc/g, aunque variará en función de distintos factores, como el estado inmunitario del individuo y la virulencia de la cepa (FAO/WHO, 2004). En la **Tabla I.2** se muestran los casos de listeriosis confirmados en España y en la UE durante el período 2006-2012.

Tabla I.2.

Casos de listeriosis en España y en la UE durante el período 2006-2012.

Año	España	UE
2006	78	1.591
2007	82	1.581
2008	88	1.425
2009	121	1.675
2010	129	1.643
2011	91	1.486
2012	107	1.642

Fuente: EFSA (2012; 2014).

Dada su capacidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas, en ambientes ácidos y en anaerobiosis o en concentraciones bajas de oxígeno, *L. monocytogenes* puede multiplicarse en una gran variedad de alimentos, como productos lácteos, carnes frescas de mamíferos y aves, productos cárnicos fermentados y pasterizados, pescados y mariscos tanto frescos como ahumados, frutas, verduras y hortalizas. Los principales causantes de brotes de listeriosis son los alimentos listos para el consumo (RTE, del inglés *ready to eat*), en los que la contaminación se produce tras el tratamiento térmico (si lo hay) o en las operaciones de corte, loncheado, etc. y/o el envasado (FAO/WHO, 2004). Por todo ello, las autoridades alimentarias nacionales y supranacionales establecen criterios estrictos para el control de este microorganismo.

En la UE, el Reglamento (CE) nº 2073/2005 (modificado posteriormente por los Reglamentos nº 1441/2007 y nº 365/2010), *relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*, obliga a las empresas alimentarias a adoptar medidas como parte de sus procedimientos basados en los principios de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) y la aplicación de buenas prácticas de higiene, para garantizar que se cumplan los criterios de higiene del proceso y de seguridad alimentaria (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005; Comisión Europea, 2007, 2010c). De acuerdo con esta normativa, los fabricantes de alimentos RTE que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* deberán garantizar como criterio de seguridad alimentaria un límite de 100 ufc/g de este microorganismo durante la vida útil o bien la ausencia del mismo en 25 g antes de que el alimento haya abandonado la industria. Por otra parte, si se trata de alimentos RTE que no favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes* ($\text{pH} \leq 4,4$, $a_w \leq 0,92$, o $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$), la legislación establece únicamente el límite de 100 ufc/g durante la vida útil. Otros países, como Canadá, Australia o Nueva Zelanda siguen criterios de seguridad alimentaria para este microorganismo similares a los europeos. En 2008, la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE.UU. publicó un borrador proponiendo el límite de 100 ufc/g para los alimentos RTE que no permitieran el crecimiento de *L. monocytogenes* (FDA, 2008). A pesar de ello, en la actualidad este país aplica un nivel de “tolerancia cero” para cualquier tipo de alimento, es decir, ausencia en 25 g de producto.

La **Figura I.2** muestra la proporción de muestras de diversos alimentos RTE que no cumplieron con la legislación comunitaria durante el período 2011-2012. Como se puede observar, el pescado y los productos cárnicos, incluyendo embutidos fermentados y jamón curado, fueron los alimentos que más excedieron los límites legales (>100 ufc/g) (EFSA, 2014).

2.4.2. *Salmonella* spp.

La familia *Enterobacteriaceae* comprende un grupo extenso de bacilos Gram-negativos no formadores de esporas, casi todos ellos anaerobios facultativos, catalasa-positivos, oxidasa-negativos y con la capacidad de reducir el nitrato a nitrito. Son microorganismos muy ubicuos y muchos de ellos forman parte de la microbiota

natural del tracto intestinal de los mamíferos, por lo que su presencia en las plantas de procesamiento de alimentos es difícil de evitar. No obstante, su detección en concentraciones significativas es un indicador de condiciones higiénicas deficientes durante la elaboración y manipulación de los alimentos.

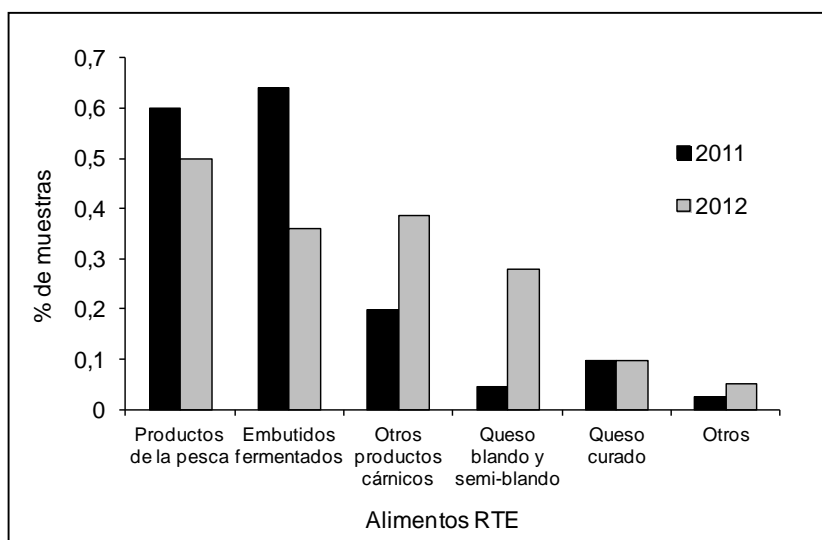


Figura I.2. Porcentaje de muestras de diversos alimentos RTE que no cumplieron con la legislación comunitaria para *L. monocytogenes* (>100 ufc/g) durante el período 2011-2012. Fuente: EFSA (2014).

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se incluyen distintos microorganismos responsables de toxiinfecciones alimentarias, como *Salmonella* spp. Los miembros de este género se encuentran principalmente en el tracto intestinal de los animales y destacan por su gran capacidad de adaptación, lo que les permite infectar a una amplia variedad de hospedadores. Estas bacterias pueden multiplicarse entre 5,3 y 46 °C y pH entre 3,8 y 9,5 (aunque la mayoría de serotipos no crecen por debajo de 7 °C y 4,5, respectivamente). El valor óptimo de a_w para su multiplicación es de 0,99, aunque también pueden crecer en alimentos con a_w de 0,94 (Bell y Kyriakides, 2002).

El género *Salmonella* comprende dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. A su vez, *S. enterica* se divide en seis subespecies, entre las cuales destaca

la subespecie *enterica*, ya que agrupa a la mayoría de las bacterias del género que se aíslan de animales de sangre caliente, incluido el hombre (EFSA, 2014). Los serotipos o serovares de *S. enterica enterica* pueden clasificarse en grupos desde un punto de vista epidemiológico según estén más o menos adaptados a una especie hospedadora (Kingsley y Bäumler, 2000). *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son serovares no adaptados a hospedadores específicos, que se aíslan de una gran variedad de animales y del ambiente (Uzzau *et al.*, 2000). Estos serovares son los que con más frecuencia originan brotes de salmonelosis en el hombre asociados principalmente al consumo de carne y huevos, respectivamente. Estos microorganismos provocan enterocolitis, que suele resolverse a los 2-7 días sin ayuda de terapia antimicrobiana, aunque puede derivar en complicaciones en niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos, siendo necesario el uso de antibióticos (Ruiz *et al.*, 2004).

En la UE, *Salmonella* es la primera causa de brotes de toxiinfección alimentaria, con 91.034 casos confirmados en 2012, correspondiéndose con una incidencia de 22,2 casos por cada 100.000 habitantes. De ellos, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, con el 41% y el 22% de los casos, respectivamente, fueron los serotipos aislados con más frecuencia. A pesar de ello, durante los últimos años se observa una clara disminución de los casos de salmonelosis en la UE, con una reducción del 32% desde 2008 (EFSA, 2014).

Aunque la mayoría de los casos de salmonelosis en el hombre se deben al consumo de huevos y carne de pollo, la carne de cerdo también representa una importante fuente de infección (EFSA, 2014; Fedorka-Cray y Wray, 2000; Maguire *et al.*, 1993). En general, se estima que un 7-23% de los casos de salmonelosis en la UE están asociados al consumo de carne de cerdo y sus derivados, con un número importante causado por *S. Typhimurium* (VLA/RIVM/Food-DTU, 2011). Berends *et al.* (1998) estimaron que del total de casos de salmonelosis atribuidos a *S. Typhimurium*, un 50% estaría vinculado al consumo de cerdo y derivados.

2.4.3. *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum comprende cuatro grupos fenotípicos distintos (I-IV) de bacterias Gram-positivas, anaerobias, formadoras de esporas, y caracterizadas, junto

con *Clostridium butyricum* y *Clostridium baratii* (Suen *et al.*, 1988) por la producción de una potente neurotoxina responsable del botulismo, la toxina botulínica. En realidad, los cuatro grupos fenotípicos corresponden a cuatro grupos filogenéticamente muy distintos que se mantienen bajo el nombre de *C. botulinum* por cuestiones prácticas y por su importancia como patógenos de humanos y animales (Collins y East, 1998).

Existen tres tipos de botulismo: alimentario, infantil y de herida. El botulismo alimentario está causado por el consumo de productos que contienen la toxina sintetizada durante el crecimiento del microorganismo y es el que se tratará en este apartado debido a sus implicaciones en la seguridad alimentaria. Por su parte, el botulismo infantil (que se produce en niños menores de 3 años) también tiene un origen alimentario, pero en este caso se debe a la ingesta de las propias esporas presentes en ciertos alimentos, como la miel, que al establecerse en el tracto intestinal, germinan, se multiplican y forman la toxina (Aureli *et al.*, 2002).

En relación con la presencia de *C. botulinum* en los alimentos, en la **Tabla I.3** se resumen algunas de las propiedades fisiológicas más importantes de los distintos tipos, entre los que se aprecian grandes diferencias. En el caso particular de los grupos I y II, se observa que las cepas proteolíticas de *C. botulinum* tienen una temperatura mínima de crecimiento superior a la de las no proteolíticas (10-12 °C frente a 2,5-3 °C), pero son ligeramente más resistentes al pH y a la concentración de sal. Además, durante el crecimiento de *C. botulinum* en los alimentos, las cepas proteolíticas producen olores desagradables, lo que reduce el riesgo de consumo del alimento. En cambio, la no generación de olores desagradables por parte de las cepas no proteolíticas permite la producción de la toxina sin que el alimento presente síntomas de deterioro.

Aunque las esporas de *C. botulinum* pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el aire y pueden germinar en presencia de oxígeno, la existencia de condiciones anaeróbicas es un requisito para que las células vegetativas puedan multiplicarse y producir la toxina. Hasta la fecha se han descrito siete tipos de neurotoxinas distintas (A-G), producidas por las diferentes cepas de *C. botulinum*, *C. butyricum* y *C. baratii*, aunque la mayoría de los casos de botulismo alimentario en humanos se deben a los tipos A, B y E (y raramente F) de los grupos I y II (Johnson, 2013). A grandes rasgos, todas las neurotoxinas están formadas por dos moléculas,

una larga de 100 kDa y una corta de 50 kDa, unidas por puentes disulfuro. A su vez, estas dos cadenas están unidas a una proteína denominada NTNHA que protege la neurotoxina de la degradación durante su paso por el tracto gastrointestinal (proteasas, pH ácido, etc.) tras la ingesta del alimento contaminado. Cuando el complejo neurotoxina-NTNHA llega al intestino, ésta pasa al torrente circulatorio, desprendiéndose previamente de la proteína protectora, y viaja a través de la sangre hasta unirse (por la cadena larga) a receptores de membrana de las neuronas motoras. Finalmente tiene lugar el paso de la cadena corta al citoplasma, impidiendo la liberación de los neurotransmisores y bloqueando la transmisión sináptica. En un primer momento se inhibe el paso de estímulos de los nervios motores a los músculos de la cabeza y el cuello. Con el paso de las horas, el proceso avanza hasta que el corazón, el diafragma y los músculos intercostales dejan de funcionar, produciéndose la muerte del individuo (Dorner *et al.*, 2013).

Tabla I.3.

Características fisiológicas de *Clostridium botulinum* formadores de neurotoxina.

	Grupo			
	I	II	III	IV
Tipo de toxina	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Proteolisis	+	-	-	+
Temperatura óptima de crecimiento	37 °C	25 °C	40 °C	37 °C
Temperatura mínima de crecimiento	10-12 °C	2,5-3,0 °C	15 °C	<i>d.i.</i>
pH mínimo de crecimiento	4,6-4,8	5	<i>d.i.</i>	<i>d.i.</i>
Concentración máxima de NaCl	10%	5%	3%	>3%
A _w mínima de crecimiento	0,94	0,97	<i>d.i.</i>	<i>d.i.</i>

d.i.: datos insuficientes.

Adaptado de: Johnson (2013); Lund y Peck (2000).

En la actualidad, el botulismo es una enfermedad poco común en la UE y particularmente en España (**Tabla I.4**). A pesar de ello, dado que el consumo de tan solo 30 ng de toxina es suficiente para producir enfermedad o incluso la muerte (Lund y Peck, 2000), *C. botulinum* es un microorganismo realmente peligroso. En general, los casos de botulismo suelen ser esporádicos o en forma de pequeños brotes

comúnmente intrafamiliares, aunque ocasionalmente se dan brotes de mayor entidad. En la mayoría de los casos, éstos se deben al consumo de productos de elaboración casera, como conservas vegetales, productos cárnicos y de pescado, por deficiencias higiénicas durante su elaboración o conservación. Asimismo, si bien los casos relacionados con el consumo de alimentos procesados industrialmente son poco frecuentes, éstos provocan importantes costes económicos para el sector (Peck, 2006). En la **Tabla I.5** se muestran algunos casos de botulismo alimentario que han tenido lugar en los últimos años.

Tabla I.4.
Casos de botulismo confirmados en España y en la UE durante el período 2008-2012.

Año	España ¹	Ratio ²	UE ¹	Ratio ²
2008	5	0,01	112	0,02
2009	6	0,01	132	0,03
2010	4	0,01	102	0,02
2011	7	0,02	114	0,02
2012	5	0,01	72	0,01

¹Casos confirmados.

²En 100.000 habitantes.

Fuente: ECDC (2014).

En lo referente a la carne y los productos cárnicos, a lo largo de la historia, y particularmente durante la Segunda Guerra Mundial, el consumo de estos alimentos, sobre todo los de elaboración casera, fueron fuente de numerosos casos de botulismo debido a las pobres condiciones higiénicas durante el sacrificio de los animales, la falta de refrigeración y la escasez de sal (Lücke y Roberts, 1993; Tompkin, 1980). Por el contrario, en la actualidad son pocos los casos de botulismo en los que estos alimentos están implicados, debido al bajo número de esporas presentes (0,1-7 esporas/kg) (Hauschild, 1989) como consecuencia de la mejora de las condiciones higiénicas durante la producción. En el caso concreto de los productos crudos curados, la combinación de diferentes factores, como el bajo pH, la elevada concentración de sal,

la baja a_w y la presencia de nitrito, hace de ellos unos alimentos estables y seguros (Hauschild, 1989).

Tabla I.5.

Brotes de botulismo alimentario desde el año 2000.

Año	País	Producto	<i>C. botulinum</i> ¹	Toxina	Casos
2000	Francia	Sopa de espárragos ^a	P	B	9
2001	EE.UU.	Salsa de chile congelada ^b	P	A	16
2001	Australia	Pollo recalentado ^d	NP	E	1
2001	EE.UU.	Cola y pata de castor fermentada ^a	NP	E	3
2001	Canadá	Huevas de salmón fermentadas ^{a,*}	NP	E	4
2002	Suráfrica	Sardinias en lata ^b	P	A	2; 2 [†]
2002	Canadá	Patatas asadas en papel de aluminio ^c	P	A	1
2002	EE.UU.	<i>Muktuk</i> (de ballena beluga) ^d	NP	E	12
2003	Alemania	Pescado salado y secado al aire ^a	NP	E	3
2003	Francia	Salchicha halal ^b	?	B	4
2004	Alemania	Salmón ahumado a vacío ^b	NP	E	1
2004	EE.UU.	<i>Pruno</i> (vino) ^{d,*}	P	A	5
2004	Italia	Aceitunas verdes en salmuera ^c	?	B	16
2005	Turquía	<i>Suzme</i> (yogur) ^a	P	A	10; 2 [†]
2005	EE.UU.	Pescado salado sin eviscerar ^a	NP	E	5
2005	Italia	Alimento en conserva para bebés ^a	P	A	1; 1 [†]
2006	EE.UU.	Tofu fermentado ^a	P	A	2
2006	Tailandia	Brotes de bambú en conserva ^a	P	A	209
2006	Canadá/ EE.UU.	Zumo de zanahoria refrigerado ^b	P	A	6; 1 [†]
2006	Irán	<i>Ashmast</i> (sopa) ^d	NP	E	11
2006	Finlandia	Pescado blanco ahumado y a vacío ^b	NP	E	1
2006	Taiwán	<i>Cinkrugan</i> (cabra fermentada) ^d	?	B	5
2007	EE.UU.	Salsa de chile ^b	P	A	4
2007	Australia	Plato de nachos ^d	P	A	1
2008	Francia	Enchilada de pollo ^b	P	A	2
2009	Francia	Pescado blanco ahumado y a vacío ^b	NP	E	3

¹ Proteolítico (P), no proteolítico (NP); [†] Fallecimientos.

^a Elaboración casera; ^b Producto comercial; ^c Servido en restaurante; ^d Desconocido.

* Dos brotes.

Fuente: Peck *et al.* (2011).

3. Sales de curado

Los principales agentes de curado son el cloruro sódico y los nitratos y nitritos.

El cloruro sódico ejerce un efecto bacteriostático en ciertos microorganismos, ya que reduce la a_w . Participa además en el desarrollo de la textura al incrementar la solubilidad de las proteínas miofibrilares y proporciona al producto el típico sabor salado.

La adición de nitrato y/o nitrito sódico o potásico es una práctica habitual en la elaboración de productos curados. Como ya se ha comentado, durante siglos el nitrato se añadía de forma no intencionada, ya que se encontraba en la sal como impureza. No fue hasta principios del siglo XX, con los avances científicos, cuando se comenzó a estudiar la química del curado y se comprobó que el nitrito era el verdadero responsable del color característico de los embutidos. Más adelante se demostró que dicho compuesto también participaba en el desarrollo del sabor y aroma y en el control de las bacterias patógenas y alterantes que podrían desarrollarse en el producto.

En la actualidad, los nitratos se utilizan generalmente en embutidos de maduración larga y en jamón curado, y su papel fundamental es actuar como reserva de nitrito durante el proceso de curación. Por el contrario, los nitritos, que se pueden generar a partir de la reducción del nitrato, o bien se pueden añadir directamente en la formulación, participan activamente en la maduración mediante la formación del color y aroma típico de estos productos, a lo que hay que añadir un importante efecto conservador y antioxidante.

3.1. Química de los nitratos y nitritos

La química del curado de la carne es muy compleja, dado que el nitrito es un compuesto altamente reactivo que puede funcionar como agente oxidante, reductor y nitrosante, dando lugar a distintos compuestos de los cuales parece claro que el NO es esencial para la mayoría de las reacciones del curado (Honikel, 2008; Møller y Skibsted, 2002). En los últimos años se ha conseguido un mejor conocimiento de las reacciones del curado de la carne, gracias a la intensa actividad investigadora que se ha llevado a cabo en relación con las funciones biológicas del NO (Sebranek y Bacus, 2007).

El nitrógeno en su forma gaseosa (N_2) es una molécula inerte a temperatura ambiente. No obstante, el átomo de nitrógeno en sí mismo es un elemento químico muy reactivo, dado que puede adoptar una amplia variedad de estados de oxidación. Esto se debe a que su capa externa de 5 electrones (s^2p^3) puede captar tres electrones adicionales, dando lugar al estado de oxidación N^{3-} (como existe en el amoníaco, NH_3) o ceder sus 5 electrones, adoptando el estado de oxidación N^{5+} (como ocurre en el ácido nítrico, HNO_3). En la **Figura I.3** se muestran los principales compuestos nitrogenados que se pueden formar en sus distintos estados de oxidación; de ellos los más interesantes en el proceso de curado de la carne son los compuestos con oxígeno (Honikel, 2008).


Carga electrónica del nitrógeno		 oxidación
NH_3	-3	
N_2	0	
N_2O	+1	
NO	+2	
HNO_2/N_2O_3	+3	
NO_2	+4	
HNO_3	+5	

Figura I.3. Estados oxidativos del nitrógeno. Fuente: Honikel (2008).

El nitrato sódico ($NaNO_3$) y el nitrato potásico (KNO_3) son compuestos poco reactivos y no participan directamente en el curado, debiendo para ello reducirse primeramente a nitrito ($NaNO_2/KNO_2$), compuesto mucho más reactivo (**Figura I.4**). Esta reacción, como se ha comentado, se debe principalmente a la actividad de la enzima nitrato reductasa producida por los CGC+ presentes en la carne (Gøtterup *et al.*, 2008), aunque también puede darse, en menor medida, por enzimas como algunas metaloproteínas presentes en los tejidos musculares de los mamíferos, como la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa y las hemoproteínas (Jansson *et al.*, 2008).

En un embutido el nitrito entra en un equilibrio dinámico, altamente dependiente del pH del medio, con el ácido nitroso (HNO_2), cuyo valor de pK_a es 3,37. Antes de que se produzca la fermentación, como el embutido tiene un pH de alrededor de 5,5, el 99%

del nitrito se encuentra en su forma aniónica (el ión nitrito, NO_2^-) solubilizado en la fracción acuosa de la carne. Pero el descenso del pH producido por el crecimiento explosivo de las BAL favorece la conversión del NO_2^- a HNO_2 . Seguidamente, el HNO_2 da lugar a su anhídrido, el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), el cual a la vez sufre una reacción de desproporción en medio ácido. En estas reacciones, el nitrógeno en un estado de oxidación intermedio actúa a la vez como oxidante y reductor para formar dos compuestos, uno en el que el nitrógeno ha disminuido su número de oxidación y otro en el que ha aumentado. Así, el N_2O_3 entra en equilibrio con el NO y el dióxido de nitrógeno (NO_2) (Hammes, 2012; Honikel, 2008). A partir de la dimerización del NO_2 se forma tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4), que a su vez se desproporciona para formar nuevo HNO_2 y ácido nítrico (HNO_3). La sucesiva disociación del HNO_3 en ión nitrato (NO_3^-) hace recomendable la presencia de bacterias nitrato reductoras en el producto, incluso cuando únicamente se emplea nitrito como agente de curado (Hammes, 2012; Honikel, 2008).

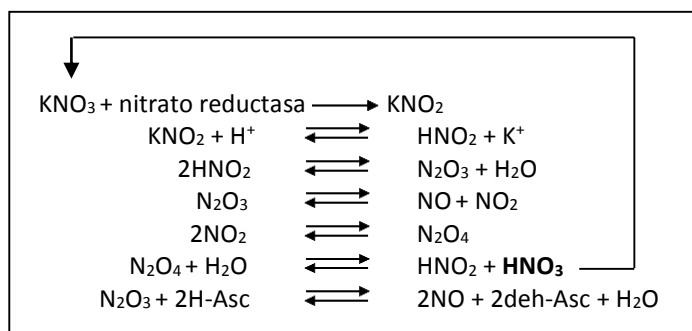


Figura I.4. Reacciones del nitrato y nitrito en los productos curados. 2H-Asc: forma oxidada del ascorbato; 2deh-Asc: forma reducida del ascorbato. Fuente: Hammes (2012).

En presencia de agentes reductores, como el ascorbato o el eritorbato, el N_2O_3 da lugar a un conjunto de intermediarios, entre los que destacan el NO y su forma reducida, el nitroxilo (HNO). Estos tres compuestos (N_2O_3 , NO y HNO) son los principales responsables de las propiedades del nitrito en el curado (Skibsted, 2011).

3.2. Funciones de los nitratos y nitritos

Como consecuencia de las reacciones del curado se generan distintos compuestos nitrogenados intermediarios que pueden reaccionar con diversos componentes de la carne, jugando un papel muy importante en la formación del color, sabor y aroma típicos de los productos cárnicos, además de presentar actividad antioxidante y antimicrobiana frente a distintos microorganismos.

3.2.1. *Efecto en el color*

Uno de los efectos más importantes que tiene el nitrito en los productos cárnicos crudos curados es la formación del color típico. Este proceso tiene lugar a través de una secuencia compleja de reacciones que conducen a la formación de nitrosomioglobina, que imparte el característico color rojo violáceo a estos productos (**Figura I.5**).

Cuando se elaboran embutidos, la oximioglobina es el pigmento dominante en la carne recién picada, dado que las operaciones de corte aumentan la superficie de la carne expuesta al oxígeno. Al añadir nitrito a la carne picada, ésta se vuelve parda en pocos minutos por la formación de metamioglobina. Esto se debe a que el NO, bien formado en la secuencia de reacciones del nitrito anteriormente descritas en las condiciones de acidez generadas por el crecimiento de las BAL, o bien en la oxidación de la mioglobina por el nitrito, es un potente agente oxidante del pigmento oximioglobina. Esta reacción, que ocurre de forma espontánea a temperatura ambiente, se acelera en presencia de otros agentes oxidantes como la sal. La metamioglobina así formada sufre en pocas horas una reducción (de ión férrico a ferroso) por parte de agentes reductores endógenos (como la metamioglobina reductasa y los grupos reductores de algunos aminoácidos) o añadidos en la fórmula como el ascorbato (Skibsted, 2011). Finalmente, el NO formado en la oxidación de la mioglobina por el nitrito y el procedente de la secuencia de reacciones del nitrito anteriormente descritas en las condiciones de acidez generadas por el crecimiento de las BAL, se une a la mioglobina, formando el pigmento nitrosomioglobina (Hammes, 2012; Honikel, 2008; Sebranek y Bacus, 2007; Skibsted, 2011).

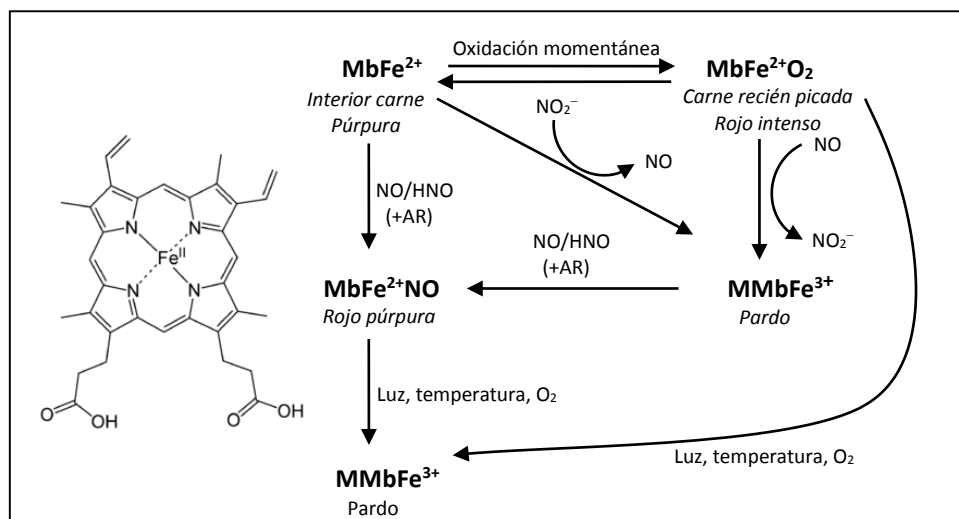
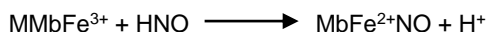


Figura I.5. Grupo hemo de la mioglobina (izquierda) y esquema de las reacciones del curado para la formación del color (derecha). MbFe²⁺, mioglobina nativa; MbFe²⁺O₂, oximioglobina; MMbFe³⁺, metamioglobina; MbFe²⁺NO, nitrosomioglobina; AR, agentes reductores. Adaptado de: Skibsted (1992).

El N₂O₃ es un compuesto fundamental en las reacciones que se producen con el ascorbato, que dan lugar a la formación de HNO, entre otros compuestos. Hasta épocas recientes no se ha considerado al HNO como un intermediario reactivo en el curado de la carne. Sin embargo, este compuesto, que es la forma reducida del NO, aunque de vida corta, podría ser el agente nitrosante de la metamioglobina, a través de la siguiente reacción (Miranda *et al.*, 2003):



En general, la adición de tan solo 40-50 mg/kg de nitrito permite el correcto desarrollo del color en los productos curados (Froehlich *et al.*, 1983). Si no se adicionan nitratos y nitritos durante la elaboración de los embutidos no tiene lugar la formación del pigmento característico (Pichner *et al.*, 2006). En cambio, en el jamón de Parma, fabricado también sin adición de nitrato/nitrito, pero con un largo período de maduración, se forma un pigmento rojo llamado Zn-protoporfirina por una reacción de

transmetalación entre la mioglobina (Fe^{2+}) y proteínas con Zn (Zn^{2+}). Aunque no se conoce con detalle el mecanismo fundamental de formación de este pigmento, parece que la presencia de nitrato y nitrito, y más concretamente de NO, interfiere en su formación (Wakamatsu, Nishimura *et al.*, 2004; Wakamatsu, Okui *et al.*, 2004; Wakamatsu *et al.*, 2010).

3.2.2. Efecto en el sabor y aroma

El desarrollo del sabor y aroma de las carnes curadas es muy complejo, pues es el resultado de la actividad microbiana, de las enzimas propias de la carne, de los ingredientes utilizados y de fenómenos puramente químicos como la oxidación lipídica y las reacciones del nitrito (Hierro *et al.*, 2014), si bien éste es probablemente el aspecto peor conocido de la química del nitrito. Parece que, al igual que con el color, la adición de 40-50 mg/kg de nitrito permiten el correcto desarrollo del sabor y aroma típicos de los productos cárnicos curados (Mac Donald *et al.*, 1980).

Los primeros estudios que relacionaron el sabor y aroma de los productos cárnicos curados con el nitrito se realizaron en *bacon* (Brooks *et al.*, 1940). Estas observaciones fueron confirmadas posteriormente por distintos autores en diferentes productos cocidos y crudos curados (Mottram y Rhodes, 1974; Noel *et al.*, 1990; Wasserman, 1973). Podría hablarse de una participación directa e indirecta de los nitratos y nitritos en el sabor y aroma de las carnes curadas. Parece ser que algunos de los compuestos volátiles que contribuyen al aroma “a curado” se originan a partir de la reacción de sustancias propias de la carne con el nitrito o con el NO. Es el caso de nitrilos, como el benzonitrilo y el fenilacetónitrilo, que han sido identificados en productos curados sometidos a tratamiento térmico (Donald *et al.*, 1984). Algunos nitrilos han sido también detectados en productos madurados (Ruiz *et al.*, 1999; Stahnke, 1995), aunque no de forma habitual, por lo que la formación de estos compuestos se relacionaría estrechamente con la aplicación de calor.

Por otra parte, los nitratos y nitritos participarían de forma indirecta en el sabor y aroma de los productos curados a través del llamado aroma “a maduro”, mediante la modulación de la oxidación lipídica y un posible incremento de la degradación de aminoácidos como la valina, leucina e isoleucina (Olesen *et al.*, 2004; Stahnke, 1995).

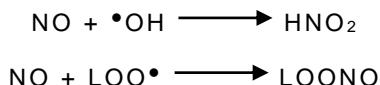
Parece que ambas sales de curado no tienen el mismo efecto en el aroma de los productos curados. Marco *et al.* (2006) y Marco *et al.* (2008) observaron un incremento de los compuestos volátiles derivados de la degradación de aminoácidos y de la fermentación de carbohidratos y una reducción de la oxidación lipídica en embutidos elaborados únicamente con nitrato en comparación con los elaborados con nitrito. Por otra parte, se ha observado que la sustitución de los nitratos y nitritos por otros antioxidantes no da lugar a productos con el típico aroma de las carnes curadas, lo que indicaría un papel específico de los nitrificantes en la generación de compuestos volátiles más allá de un simple efecto antioxidante (Sebranek y Bacus, 2007).

3.2.3. Actividad antioxidante

El nitrito (sobre todo en forma de NO) puede actuar como un compuesto altamente oxidante y reductor a la vez. Por un lado, el NO puede oxidar metaloproteínas o promover la oxidación de proteínas y lípidos mediante la generación de peroxinitrito (ONOO^-) (Carlsen *et al.*, 2005):



Por otra parte, el nitrito también puede actuar como agente reductor, lo que le confiere capacidad antioxidante que, al proteger a los lípidos del enranciamiento modula la generación del sabor y aroma en los productos curados. Se han propuesto diversos mecanismos que tratan de explicar la actividad antioxidante del nitrito y sus derivados. Honikel (2008) la atribuye a la oxidación del NO a N_2O_3 , secuestrando así el oxígeno presente en la matriz cárnica. Otros autores la atribuyen a la acción del NO que, al ser un compuesto lipofílico, se combinaría fácilmente con los radicales libres formados en la oxidación lipídica (Carlsen *et al.*, 2005; Kanner *et al.*, 1991):



Finalmente, la propia nitrosomioglobina podría considerarse como un agente antioxidante, tanto por actuar como reservorio de NO, como por su capacidad para

desactivar radicales libres (Carlsen *et al.*, 2005). Asimismo, la unión del NO con el hierro del anillo de porfirina de la mioglobina o con complejos cisteína-hierro de otras proteínas evita que este ion metálico actúe de catalizador de la oxidación lipídica (Kanner *et al.*, 1984).

3.2.4. Actividad antimicrobiana

Una de las principales razones por las que se emplean los nitratos y nitritos en los productos cárnicos es su actividad antibacteriana. Sin embargo, pese a que los inicios de su empleo se pierden en la historia, no fue hasta el siglo XX que se tuvo constancia científica de esta actividad (Honikel, 2008).

Inicialmente, la adición intencionada de sales nitrificantes a los productos cárnicos se basó en la formación del color. Posteriormente se descubrió que, mientras que el nitrato no presentaba actividad antimicrobiana alguna, el nitrito controlaba la proliferación de *C. botulinum* y la producción de su toxina, así como el crecimiento de bacterias putrefactivas causantes del deterioro de la carne (Benjamin y Collins, 2012). Se ha señalado que los nitritos también contribuyen a controlar otros microorganismos patógenos, como *L. monocytogenes* (Cammack *et al.*, 1999; Shahmat *et al.*, 1980) y *E. coli* O157:H7 (Morita *et al.*, 2004). Por otra parte, también se ha descrito un efecto inhibitorio sobre *S. aureus* y *Salmonella* spp., aunque existe cierta controversia al respecto (Gibson y Roberts, 1986; Leistner, 1995; Lücke, 1998; Yarbrough *et al.*, 1980).

Aunque los mecanismos moleculares de la inhibición microbiana aún no se conocen con exactitud, parece claro que el nitrito debe transformarse primero en HNO_2 , reacción que tiene lugar en medio ácido (Honikel, 2008). El HNO_2 es muy inestable y se disocia rápidamente dando lugar a varias especies reactivas, como el NO, NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4 o NO_2^- (Lundberg *et al.*, 2004), y que son las verdaderas responsables de la actividad antimicrobiana del nitrito.

En el caso concreto del NO, éste presenta un electrón desapareado que le confiere gran capacidad de reacción con electrones desapareados de otros átomos y moléculas (**Figura II.6**), lo que explica, por ejemplo, la formación en condiciones aeróbicas de otra especie reactiva, el ONOO^- . Pero además, el NO también puede reaccionar con grupos tiol de aminoácidos y con iones metálicos de proteínas

formándose S-nitrosotioles (S-NO) y complejos metálicos de nitrosilo, respectivamente, ambos también especies reactivas de nitrógeno. Estos dos compuestos, junto al N_2O_3 , el N_2O_4 y los compuestos N-nitroso, son considerados potentes agentes nitrosantes y actúan de liberadores lentos de NO para que éste pueda interactuar con otras biomoléculas, extendiendo así su corta vida (Cammack *et al.*, 1999).

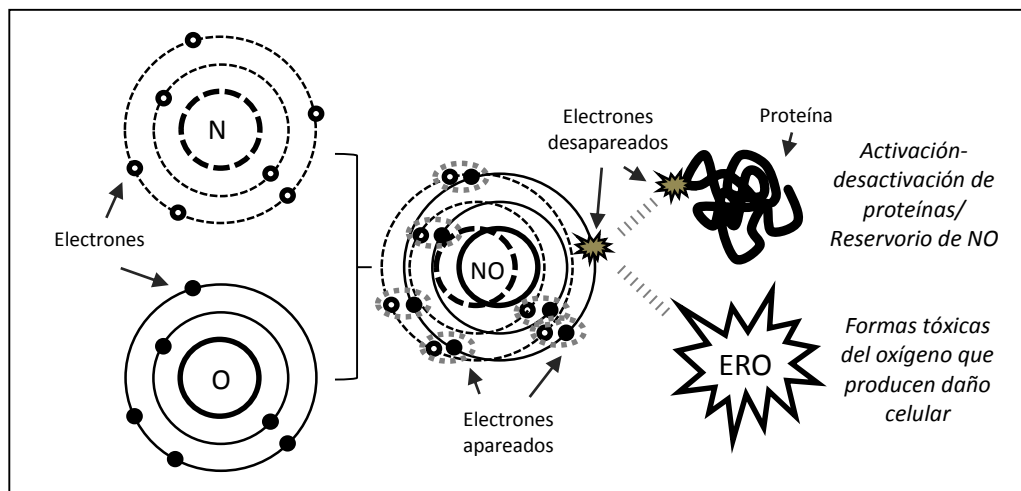


Figura I.6. Representación de la molécula de óxido nítrico (NO). El NO posee un electrón desapareado que puede interactuar rápidamente con otras moléculas que también tienen electrones desapareados, tales como las proteínas o las especies reactivas de oxígeno (ERO).

Finalmente, todos estos óxidos de nitrógeno pueden reaccionar con una amplia variedad de moléculas de las bacterias, como las proteínas hierro-azufre, aminoácidos, aminas, ácidos nucleicos y lípidos (Fang, 1997) mediante N y S-nitrosilación, nitración, formación de puentes disulfuro, formación de compuestos nitrosil-hemo, interacción con radicales o por peroxidación lipídica (Lundberg *et al.*, 2004). En consecuencia, se produce una interferencia con las funciones de proteínas (enzimas), membranas y ADN, lo que puede desencadenar la alteración del metabolismo energético, del transporte de nutrientes y de la multiplicación celular (Cammack *et al.*, 1999). En la **Tabla I.6** se detallan los mecanismos por los que las distintas especies reactivas del nitrógeno ejercen su efecto antimicrobiano.

Tabla I.6.

Mecanismos de acción antimicrobiana de las especies reactivas de nitrógeno.

Diana	Mecanismo	Compuestos responsables
ADN		
Daño oxidativo del ADN (p. ej. rotura, entrecruzamiento o desaminación)	N-nitrosilación	N_2O_3 , $ONOO^-$, NO_2^\bullet
Filamentación	S-nitrosilación	S-NO
Proteínas		
Grupos tiol (p. ej. en gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, γ -glutamylcisteinil sintetasa)	S-nitrosilación, formación de puentes disulfuro	S-NO, N_2O_3 , NO
Grupos hemo (p. ej. en citocromos o catalasa)	Formación de nitrosil-hemo	NO, S-NO
Grupos hierro/zinc-azufre (p. ej. aconitasa, piruvato-ferredoxina oxidorreductasa, o proteínas de unión al ADN)	S-nitrosilación	NO, $ONOO^-$
Tirosina (disrupción de la fosforilación de la tirosina, modificación de la función proteica)	Nitración	$ONOO^-$, $NO_2^- + H_2O_2$
Radicales tirosilo (p. ej. en ribonucleótido reductasa)	Interacción con NO^\bullet	NO^\bullet
Aminas	N-nitrosilación	N_2O_3 , N_2O_4
Pared celular		
Lípidos	Peroxidación lipídica	NO_2^\bullet , $ONOO^-$
Tioles	S-nitrosilación, formación de puentes disulfuro	S-NO, N_2O_3 , NO^\bullet

S-NO: S-nitrosotioles.

Adaptado de: Lundberg *et al.* (2004).

En los productos crudos curados, el efecto antimicrobiano de los nitritos depende de diversos factores, como su concentración, el contenido de sal, el pH, la tensión de oxígeno, o la presencia de agentes reductores, como el ascorbato. En este sentido, su actividad antimicrobiana es mayor en condiciones de anaerobiosis (Davidson *et al.*, 2002) y a pH en torno a 4,5-5,5 (Ingram, 1974). El ácido ascórbico/eritórbito y sus sales parecen potenciar la actividad antibotulínica por sus propiedades reductoras y porque secuestrarían hierro, por el que los nitritos presentan gran afinidad (Honikel, 2008; Tompkin *et al.*, 1978).

Pero además, la actividad antimicrobiana del nitrito depende del microorganismo diana. Algunas bacterias pueden metabolizar las especies reactivas del nitrógeno presentes en el medio gracias a la presencia de enzimas específicas para ello, como la nitrito/NO reductasa (Cammack *et al.*, 1999). En cambio, esta actividad enzimática es escasa o nula en otros microorganismos, como *Clostridium* spp. y *Listeria* spp., por lo que el NO y otras especies reactivas resultan tóxicos para ellos (Cammack *et al.*, 1999). Dentro del grupo de enterobacterias, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. y *Shigella* spp. son más susceptibles que *E. coli* (Dykhuizen *et al.*, 1996).

Del total de nitritos que se añade a los productos cárnicos, la mayor parte desarrolla una función antimicrobiana, mientras que sólo una pequeña fracción contribuye al color, al sabor y aroma y a la estabilidad oxidativa del producto (EFSA, 2003). La cantidad de nitritos necesaria para inhibir a *C. botulinum* varía de un producto a otro; si se aplican buenas prácticas higiénicas junto con un correcto sistema APPCC se podría prescindir de su adición en productos de corta vida útil y con un buen control de temperatura, si bien en este caso no serían “productos curados” en un sentido estricto. Para la mayoría de los productos cocidos se considera suficiente la adición de 50-100 mg/kg, mientras que para los productos crudos hasta 150 mg/kg podrían ser en ocasiones necesarios para inhibir a *C. botulinum*, en especial en piezas grandes y en productos con bajo contenido de sal y larga vida útil (EFSA, 2003).

3.3. Efecto de los nitratos y nitritos en la salud humana

La controversia sobre el empleo de nitratos y nitritos como aditivos en los alimentos se debe a sus aspectos toxicológicos. No obstante, cada vez hay más evidencias de que la ingesta en cantidades moderadas de nitratos y nitritos tiene un efecto positivo en la salud humana. En concreto, algunos de estos efectos son la reducción de la presión sanguínea y cardíaca, la protección frente a lesiones cardíacas y renales, la regulación de la función mitocondrial, la protección de la mucosa gástrica y el control de microorganismos indeseables en la cavidad oral y en el tracto urinario (Lundberg *et al.*, 2004; Lundberg *et al.*, 2011). En el organismo, el nitrato y el nitrito de la dieta pueden reducirse para formar NO (y otros óxidos de nitrógeno bioactivos), que junto con el NO endógeno que se sintetiza a partir de la L-arginina mediante la actividad

de la enzima NO-sintetasa (Gladwin *et al.*, 2005), constituiría el *pool* de NO necesario para las funciones anteriormente mencionadas (Lundberg *et al.*, 2008).

Los efectos toxicológicos de los nitratos y nitritos se relacionan con la formación de N-nitrosaminas y con el desencadenamiento de metahemoglobinemia.

En general, el nitrito es más tóxico que el nitrato. La dosis letal oral en el ser humano está establecida en 80-800 mg nitrato/kg de peso corporal, mientras que en el caso del nitrito es de 33-250 mg/kg (Schuddeboom, 1993). Por esta razón, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos estableció una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 3,7 mg/kg de peso corporal para el ion nitrato y de 0,07 mg/kg para el ion nitrito (FAO/OMS, 2002). Para la determinación de estos valores no se tiene en consideración la posible implicación de los nitratos y nitritos en la formación de nitrosaminas.

A diferencia del nitrito, cuyo uso únicamente está permitido en productos cárnicos, la adición de nitrato también está autorizada en los quesos curados (tanto duros como semiduros y semiblandos), el requesón, los sucedáneos de queso a base de leche y en dos productos de la pesca, el arenque y el espadín escabechados (Comisión Europea, 2011). En 2001, la Comisión Europea (CE) elaboró un informe sobre la ingesta de aditivos alimentarios en la UE (Comisión de las Comunidades Europeas, 2001) y aunque los resultados descritos en el mismo son fruto de una estimación conservadora de la ingesta, partiendo del supuesto de que el aditivo se encuentra en todos los productos autorizados y en los niveles máximos permitidos (sin considerar cantidades reales ni pérdidas durante el procesado), la ingesta estimada de nitrato es inferior a la IDA, mientras que la de nitrito la superaría en la población adulta y niños de corta edad (**Tabla I.7**).

Tabla I.7.
Ingesta estimada de nitrito en la UE.

Grupo poblacional	IDA (mg/kg)	IDE (%)
Adultos	0,07	40-230
Niños	0,07	50-360

IDA: Ingesta Diaria Admisible.

IDE: Ingesta Diaria Estimada en relación con la IDA.

Adaptado de: Comisión de las Comunidades Europeas (2001).

Cabe señalar que mientras que los productos curados representan la fuente principal de nitrito en la dieta, los nitratos se pueden encontrar en altas concentraciones en otros alimentos, principalmente vegetales de hoja, y en el agua (Iammarino *et al.*, 2013).

3.3.1. Formación de N-nitrosaminas

El mayor inconveniente del uso de sales nitrificantes en los alimentos reside en el potencial del HNO_2 para reaccionar con aminas, principalmente secundarias, y formar N-nitroso compuestos (NOC) con actividad carcinogénica, teratogénica y mutagénica (Hecht, 1997; Martínez *et al.*, 2000; Pegg y Shahidi, 2000). Estos compuestos pueden producirse tanto en el propio alimento como en el cuerpo humano, dependiendo su formación de la alcalinidad y concentración de aminas en el alimento (principalmente aminas secundarias), la concentración de nitrito y el pH y temperatura del medio.

Como ya se ha comentado, el nitrito se encuentra en un equilibrio altamente dependiente del pH con el HNO_2 . Pero en un medio fuertemente ácido, el HNO_2 puede protonarse dando lugar a su ácido conjugado que, al perder una molécula de agua, forma el catión nitrosonio (NO^+), que es muy reactivo. El NO^+ , que en presencia de sal se encuentra como cloruro de nitrosonio (ClNO), reacciona fácilmente con los electrones no enlazantes de los átomos de nitrógeno de las aminas, dando lugar a la formación del catión nitrosoamonio, precursor de las N-nitrosaminas (**Figura I.6**) (Ege, 2004).

La formación de nitrosaminas se favorece cuando el catión nitrosoamonio procede de una amina secundaria. En estos casos, la velocidad de formación de nitrosaminas aumenta a medida que disminuye la alcalinidad de las aminas secundarias. Por el contrario, las aminas primarias dan lugar a una especie muy inestable, el ión alquildiazonio, que se descompone rápidamente en alcoholes, alquenos y haluros de alquilo, sin que se generen nitrosaminas. Finalmente, las aminas terciarias son precursoras de aminas secundarias, que a su vez participarán en la formación de nitrosaminas. En condiciones de pH y temperatura bajas (pH 3,4 y 25 °C) este proceso tiene lugar muy lentamente, unas 10.000 veces más lentamente que la

nitrosación a partir de aminas secundarias (Mirvish, 1975), acelerándose al incrementar ambos parámetros, sobre todo a temperaturas superiores a 60 °C (Eğe, 2004; Rostkowska *et al.*, 1998).

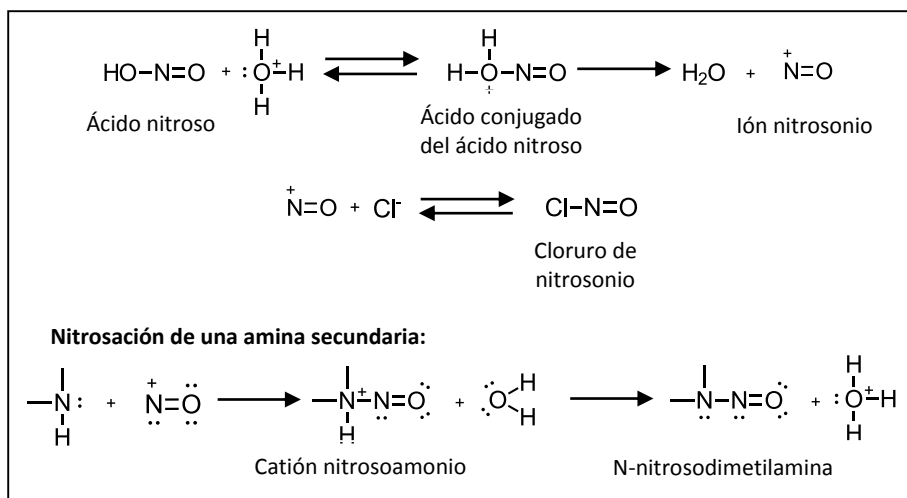


Figura I.6. Reacciones del ácido nitroso para formar el catión nitrosoamonio y la sucesiva N-nitrosamina.

Diversos autores han señalado la presencia de N-nitrosaminas en los alimentos, sobre todo en productos cárnicos. Ya en 1988, Österdahl observó que el 80% de las nitrosaminas ingeridas por la población sueca entre 1980 y 1986 provenían del consumo de carne y sus derivados. Pero las nitrosaminas no se forman por igual en todos los productos cárnicos. En la carne cruda, la probabilidad de que se formen es muy baja debido a la ausencia de nitritos y a la escasa cantidad de aminas presentes, las cuales mayoritariamente son aminas primarias derivadas de α -aminoácidos. En los productos cocidos, a pesar de la presencia de nitritos, la baja concentración de aminas presentes y su pH en torno a 6 no permiten la generación de NOC (Honikel, 2008), además de que no se alcanzan temperaturas suficientemente elevadas para promover su formación. En cuanto a los productos crudos curados la probabilidad de que se generen nitrosaminas se incrementaría a lo largo de la maduración por la formación de nuevas aminas. No obstante, en los embutidos, a pesar del ambiente ácido, la baja

concentración de nitrito residual no favorece la formación de NO^+ . En el caso del jamón curado, a las bajas concentraciones de nitrito residual hay que unir su pH próximo a 6, lo que contribuye a que los niveles de nitrosaminas sean muy bajos (Toldrá *et al.*, 2009).

A los factores anteriormente mencionados cabe añadir otros como la calidad de la materia prima utilizada (nivel de estrés de los animales, calidad microbiológica, etc.), la temperatura aplicada durante el secado y el ahumado, el uso de especias en la formulación, como la pimienta negra o el pimentón, o el uso de otros aditivos, como antioxidantes, fosfatos, azúcares o sal (Herrmann *et al.*, 2015). En este sentido, la presencia de ascorbato/eritorbato en los productos curados reduce la formación de N-nitrosaminas porque compiten con las aminas para reaccionar rápidamente con los agentes nitrosantes, como el HNO_2 , reduciéndolo a NO , o por su capacidad de unirse al NO^+ (Hu y Chen, 2010; Lathia y Blum, 1989).

Pero el principal factor responsable de la formación de N-nitrosaminas es la aplicación de tratamientos térmicos (como fritura o asado), ya que su generación se acelera significativamente a temperaturas superiores a 130 °C (Honikel, 2008). Éste sería el caso del *bacon* frito (Fiddler *et al.*, 1978) y del salami o el jamón curado que se utilizan como ingrediente de las pizzas (Deierling *et al.*, 1997; Honikel, 2008).

En general, la mayoría de los estudios realizados sobre la presencia de N-nitrosaminas en los alimentos incluyen únicamente datos sobre N-nitrosaminas volátiles (NNV), ya que éstas son altamente carcinogénicas (De Mey *et al.*, 2014; Domanska y Kowalski, 2003; Gavinelli *et al.*, 1988; Yurchenko y Mölder, 2007). Por el contrario, son pocos los estudios que hacen referencia a las N-nitrosaminas no volátiles (NNNV), ya que se cree que su posible potencial carcinogénico es inferior al de las primeras. A pesar de ello, las NNNV pueden descarboxilarse dando lugar a NNV, por lo que su presencia en los alimentos debería tenerse en cuenta (Herrmann *et al.*, 2015). Hasta la fecha, el único país que ha regulado la presencia de N-nitrosaminas en alimentos ha sido EE.UU., que establece en su legislación un máximo de 10 $\mu\text{g/kg}$ de NNV en productos cárnicos curados (Crews, 2010), sin hacer mención a los NNNV.

Habitualmente los niveles de NNV en los productos cárnicos suelen ser inferiores a 5 $\mu\text{g/kg}$ (Campillo *et al.*, 2011; Hill, 1988; Ozel *et al.*, 2010; Yurchenko y Mölder, 2007), aunque ocasionalmente se pueden encontrar niveles superiores. En los productos con

nitrato y nitrito, las NNV más comunes son la N-nitrosodimetilamina (NDMA) y la N-nitrosopirrolidina (NPYR), que se detectan en más del 50% de las muestras analizadas de *bacon*, salchichas, jamón o filetes ahumados (Herrmann *et al.*, 2015). Otras NNV que también se encuentran habitualmente en los productos cárnicos curados son la N-nitrosopiperidina, originada a partir de la pimienta negra, la N-nitrosodietilamina, la N-nitrosodibutilamina, la N-nitrosomorfolina y la N-nitrosodipropilamina (De Mey *et al.*, 2014; Domanska y Kowalski, 2003; Gavinelli *et al.*, 1988; Yurchenko y Mölder, 2007).

En cuanto a las NNNV, éstas suelen encontrarse en mayores concentraciones que las NNV en los productos curados. En 2004, Jakszyn *et al.* recopilaron datos de 207 alimentos, destacando las altas concentraciones de N-nitrosoprolina (NPRO) en muestras de salami (1.310 µg/kg), jamón crudo enlatado (790 µg/kg), ternera deshidratada (1.170 µg/kg) y ternera enlatada (7.880 µg/kg). En productos curados ahumados, como el *bacon*, es habitual encontrar altos niveles de N-nitrosotiazolidina-4-ácido carboxílico (NTCA) y N-nitrosometiltiazolidina-4-ácido carboxílico, ya que los precursores de ambas se encuentran en el humo (Massey *et al.*, 1991). Herrmann *et al.* (2015) detectaron niveles de NTCA de 2.000 µg/kg y 4.000 µg/kg en muestras de jamón y salami, respectivamente. Por otra parte, la descarboxilación de algunas NNNV, como la N-nitrososarcosina y la NPRO incrementarían los niveles de NNV, como la NDMA y la NPYR, respectivamente, siendo máxima a 200 °C (Drabik-Markiewicz *et al.*, 2009, 2011) (**Figura I.7**).

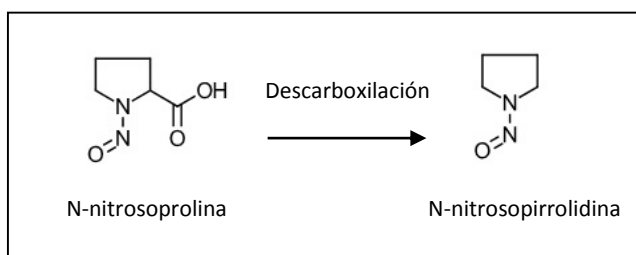


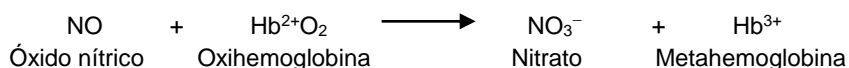
Figura I.7. Descarboxilación de la N-nitrosoprolina a N-nitrosopirrolidina por efecto del calor.

Cabe mencionar que las nitrosaminas también se pueden encontrar en las mallas elásticas de goma para productos cárnicos, como el jamón cocido, de manera que éstas pueden contaminar las partes comestibles del alimento (Fiddler *et al.*, 1998; Helmick y Fiddler, 1994). Asimismo, las nitrosaminas también se pueden formar endógenamente en el estómago y en el intestino, a partir del nitrato y el nitrito y las aminas presentes en los alimentos (Engemann *et al.*, 2013). La formación de estos compuestos en el estómago es posible gracias al pH ácido, mientras que en el intestino se debe a la actividad microbiana (Engemann *et al.*, 2013; Massey *et al.*, 1988). La formación endógena de NOC podría explicar la conexión entre una ingesta elevada de carnes rojas y el riesgo de cáncer colorrectal (Norat *et al.*, 2005; zur Hausen, 2012).

Finalmente hay que señalar que, además de las aminas, también las amidas y los ácidos grasos insaturados y sus derivados pueden reaccionar con el nitrito, formando N-nitrosamidas y alquilnitritos, respectivamente, compuestos que también son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos (Dunkel *et al.*, 1989; Engemann *et al.*, 2013). No obstante, las nitrosamidas son inestables a pH superior a 4, con lo que se degradan rápidamente en el intestino (Engemann *et al.*, 2013). Por otra parte, no existen muchos estudios sobre la presencia de alquilnitritos en los productos cárnicos (Jakszyn *et al.*, 2004).

3.3.2. Metahemoglobinemia

El NO puede oxidar la hemoglobina a metahemoglobina, inhibiendo el transporte de oxígeno a los tejidos, de acuerdo con la siguiente reacción:



El riesgo de intoxicación es especialmente importante en los niños, ya que, a diferencia de los adultos, no poseen metahemoglobina reductasa, que realiza la reacción inversa y transforma la metahemoglobina en hemoglobina reducida (Richard *et al.*, 2014).

La metahemoglobinemia se produce principalmente por el consumo de agua con concentraciones elevadas de nitratos, aunque también puede estar asociada al

consumo de vegetales (por su alto contenido en nitrato), medicamentos, o incluso deberse a la generación endógena de óxidos de nitrógeno (Richard *et al.*, 2014). En la actualidad, el consumo de productos cárnicos curados no supone un riesgo de desencadenar metahemoglobinemia, dado que su contenido en nitratos y nitritos es bajo. A pesar de ello, se han descrito algunos casos de metahemoglobinemia por consumo de estos productos, aunque siempre debido a un uso inadecuado y excesivo de sales nitrificantes (Bakshi *et al.*, 1967; Chan, 1996; Jain y Nikonova, 2013; Kennedy *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2006).

3.4. Alternativas al uso de sales nitrificantes

El creciente interés de los consumidores por productos elaborados con menos aditivos, en particular conservantes, ha impulsado la búsqueda de ingredientes naturales para tratar de sustituir a las sales nitrificantes. En este caso, la mayoría de las investigaciones se centran en el uso de vegetales de hoja verde (VHV), como el apio, las acelgas, las espinacas, el brócoli y la lechuga, por su alto contenido de nitrato natural (Santamaria *et al.*, 1999). De todos ellos, el apio en polvo, con un contenido de unos 27.500 mg/kg, suele ser el más utilizado por su menor influencia en el color y sabor del producto final (Sebranek y Bacus, 2007).

Para la sustitución de las sales nitrificantes por VHV en los productos cárnicos se requiere de la conversión del nitrato natural a nitrito, que debe realizarse rápidamente para que el nitrito pueda desarrollar su acción antimicrobiana durante las etapas iniciales del proceso. Para ello resulta imprescindible la adición de cultivos iniciadores con una intensa actividad nitrato reductasa, como *S. carnosus* (Gøtterup *et al.*, 2007; Sindelar *et al.*, 2007).

Aunque diversos autores han demostrado la aplicabilidad de los VHV en embutidos fermentados (Magrinyà *et al.*, 2009; Tsoukalas *et al.*, 2011) y en salchichas cocidas (Magrinyà *et al.*, 2012; Terns, Milkowski, Rankin *et al.*, 2011), el uso de estos sustitutos de las sales nitrificantes presenta principalmente tres inconvenientes: 1) el nitrato debe reducirse a nitrito para ejercer su actividad y lograr un curado óptimo (Terns, Milkowski, Claus *et al.*, 2011); 2) es difícil cuantificar el nitrito formado debido a su rápida reacción con otras moléculas de la matriz cárnica (Krause *et al.*, 2011); y 3)

los niveles de VHV requeridos para la obtención de productos con características sensoriales agradables son menores que los necesarios para el control de los microorganismos, lo que puede comprometer la seguridad de estos productos si no se alcanzan unos niveles de nitrito suficientes (Krause *et al.*, 2011; Sindelar *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011; Schrader *et al.*, 2009).

Con el objetivo de salvar estos inconvenientes, recientemente se han empezado a comercializar extractos en polvo con una cantidad estandarizada y conocida de nitrato pre-convertido a nitrito, que permiten su incorporación a la fórmula sin que sea necesario añadir cultivos iniciadores. Estos preparados pueden contener hasta 10.000-15.000 mg/kg de nitrito. Sin embargo, su adición a la fórmula está limitada a un 0,2-0,4% en peso debido a que cantidades mayores impartirían sabores y aromas vegetales al producto. Por tanto, la cantidad de nitrito que se añade en este caso es notablemente inferior a la de los productos a los que se añaden directamente nitratos y nitritos (Krause *et al.*, 2011). Para compensar estos bajos niveles se ha propuesto la adición de antimicrobianos naturales, como compuestos fenólicos de diversas fuentes vegetales, ácidos (como los ácidos ascórbico, cítrico y acético), humo líquido o bacteriocinas, combinados o no con la aplicación de tratamientos térmicos o no térmicos (Sebranek *et al.*, 2012).

4. Aspectos legales del uso de nitratos y nitritos en los productos cárnicos curados

Los nitratos y nitritos están recogidos en la legislación de la UE como aditivos conservadores, permitiéndose el uso de nitrito potásico (E-249) y sódico (E-250) y nitrato sódico (E-251) y potásico (E-252).

Como ya se ha comentado, a lo largo de la historia de la humanidad el uso de sales nitrificantes ha desempeñado un papel muy importante en la conservación de los alimentos. A pesar de ello, el desconocimiento de su química, junto a la falta de una regulación específica para su uso, dio lugar en épocas pasadas a algunos casos de intoxicación que en ocasiones incluso resultaron fatales (Honikel, 2008). A raíz de ello, en 1934 se legisló por primera vez en Europa, y más concretamente en Alemania, la utilización de estos compuestos, mediante la “Nitrit-Pökelsalz-Gesetz”, en la que se

limitaba la adición de nitrito a 100-120 mg/kg, siempre y cuando estuviera premezclado con sal. Unos años antes, en 1922, EE.UU. había regulado el uso de nitrato en los productos cárnicos curados, y en 1925 el de nitritos, fijando un límite máximo de 200 mg/kg de nitrito residual en el producto final (USDA, 1922, 1925).

Posteriormente fueron surgiendo normas en otros países en materia de nitratos y nitritos, pero no fue hasta 1995 cuando la UE aprobó la primera directiva comunitaria sobre aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes (Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, 1995), que se transpuso en España en el Real Decreto 145/1997 (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1997). En esta norma y en su posterior actualización (Real Decreto 142/2002, del Ministerio de Sanidad y Consumo) se recogían las cantidades añadidas indicativas y/o los niveles residuales para los nitratos y nitritos en los productos cárnicos. En concreto, se establecían para los productos crudos curados en general, y sin hacer distinción entre ellos, cantidades añadidas indicativas de 300 mg/kg y 150 mg/kg y cantidades residuales en el punto de venta de 250 mg/kg y 50 mg/kg, para nitratos y nitritos, respectivamente (**Tabla I.8**). Estos niveles se mantuvieron en posteriores modificaciones legislativas hasta que en el año 2006, la UE, tras un dictamen emitido por la EFSA (EFSA, 2003), modificó las autorizaciones en vigor con el objetivo de reducir los niveles de nitrosaminas, disminuyendo las concentraciones de nitratos y nitritos. Así, la Directiva 2006/52/CE recogía las indicaciones de la EFSA y sustituía el término “cantidad añadida indicativa” por “cantidad máxima añadida” y eliminaba las cantidades residuales excepto para los productos tradicionales (Parlamento y Consejo Europeo, 2006). En el año 2008, la UE aprobó el Reglamento 1333/2008 *sobre aditivos alimentarios* y posteriormente el Reglamento 1129/2011 transfirió los niveles y las demás condiciones de uso de nitratos y nitritos en productos cárnicos establecidos por la Directiva 2006/52/CE al anexo II del Reglamento 1333/2008, que se aplica desde el 1 de junio de 2013 (Comisión Europea, 2011).

Por otra parte, en 2008 se aprobó el Reglamento 889/2008 *sobre la producción y etiquetado de los productos ecológicos* (Comisión Europea, 2008). En esta norma se establecen unas cantidades añadidas indicativas de nitrato y nitrito de 80 mg/kg, y residuales máximas de 50 mg/kg para ambos (**Tabla I.8**).

Los cambios en la legislación europea concernientes a los niveles permitidos de nitrificantes en los productos cárnicos han sido motivados en buena parte por las reticencias del gobierno danés con respecto a su seguridad. Así, la propia Directiva 95/2/CE ya fue adoptada con el voto en contra de Dinamarca, que solicitó a la Comisión poder aplicar, como excepción, sus propias y más restrictivas disposiciones nacionales sobre el uso de nitratos y nitritos. La legislación danesa únicamente permitía la adición de nitrito a los productos cárnicos, excluyéndose el uso de nitrato en todos, salvo en el *bacon* tipo Wiltshire y el jamón crudo, en los que se permitía añadir hasta 300 mg/kg (Ministerio de Sanidad Danés, 1995). Para la mayoría de productos se fijaban dosis máximas de 60 mg/kg de nitrito, aunque se permitía su adición hasta 150 mg/kg en jamón curado y hasta 100 mg/kg en embutidos crudos curados tipo salami (**Tabla I.8**).

Tabla I.8.
Comparación de las sucesivas normas comunitarias con la legislación danesa sobre la utilización de nitratos y nitritos en los productos cárnicos crudos curados (mg/kg).

	Legislación danesa (1995)		Directiva 95/2/CE		Directiva 2006/52/CE y Reglamento 1129/2011		Reglamento 889/2008	
	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
Productos cárnicos en general	60 ^a	0	150 ^b /50 ^c	300 ^b /250 ^c	150 ^a	150 ^a	80 ^a /50 ^c	80 ^a /50 ^c
Productos cárnicos específicos:								
Embutidos crudos curados	100 ^a	0	150 ^b /50 ^c	300 ^b /250 ^c	150 ^a	150 ^a	*	*
Embutidos de larga curación ^d	*	*	150 ^b /50 ^c	300 ^b /250 ^c	0	250 ^a	*	*
					150 ^a	150 ^a		
Jamón curado	150 ^a	300 ^a	150 ^b /50 ^c	300 ^b /250 ^c	100 ^c	250 ^c	*	*

^a Cantidad máxima añadida.
^b Cantidad añadida indicativa.
^c Cantidad residual máxima en el producto final.
^d Al menos 30 días.
* No se menciona.

Fuente: Comisión Europea (2008; 2011); Ministerio de Sanidad Danés (1995); Parlamento y Consejo Europeo (1995; 2006).

A diferencia de la Directiva 95/2/CE, la norma danesa mencionaba concentraciones máximas añadidas (y no indicativas) y no contemplaba cantidades residuales máximas. La petición de excepcionalidad fue rechazada por la Comisión

Europea en una decisión adoptada en 1999, por lo que Dinamarca recurrió ante el Tribunal de Justicia de las Comunidades Europeas (TJCE), que anuló dicha decisión estimando que la Comisión no había considerado las cuestiones planteadas en 1995 por el Comité Científico sobre la Alimentación Humana (CCAH) y que, por tanto, los niveles de la Directiva 95/2/CE debían ser reconsiderados. El CCAH, transferido en 2003 a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), había dictaminado ya en el año 1990 que *“sería prudente reducir, en la medida de lo posible, el nivel de los componentes nitrogenados en la alimentación, recomendando reducir al mínimo la exposición a las nitrosaminas formadas en los alimentos por medio de prácticas tecnológicas apropiadas y, en particular, reduciendo las dosis añadidas de nitritos y nitratos al nivel mínimo indispensable para obtener el efecto conservante necesario para garantizar la seguridad desde el punto de vista microbiológico”*.

Tras la sentencia del TJCE, la Comisión se planteó el compromiso de disminuir los niveles de nitratos y nitritos en los productos cárnicos. Por ello, en el año 2003 realizó a la EFSA una consulta relacionada con la seguridad microbiológica de los productos cárnicos; en concreto sobre la correlación entre las cantidades adicionadas y residuales de nitratos y nitritos, sobre el efecto de las mismas en la inhibición de *C. botulinum* y sobre los niveles mínimos necesarios para ello. Las conclusiones de dicha consulta se publicaron a finales de ese año (EFSA, 2003) y, de forma resumida, fueron las siguientes:

- El nitrito que se añade a los productos cárnicos tiene un efecto directo sobre la seguridad microbiológica, además de contribuir al aroma, color y estabilidad oxidativa.
- Sobre el efecto inhibidor del nitrito influyen el pH, la presencia de hierro y la incorporación de ascorbato, entre otros factores.
- No se puede establecer una conclusión clara sobre la contribución de los niveles residuales de nitrito a la seguridad microbiológica.
- No hay una relación clara y directa entre las cantidades añadidas y residuales de nitrificantes, puesto que la transformación de los mismos depende de muchos factores como son el pH de la carne, la temperatura, la

- aplicación o no de un tratamiento térmico, la presencia de sustancias reductoras y de microorganismos nitrato reductores.
- Se deberían establecer los niveles autorizados de nitritos en productos cárnicos en función de la cantidad añadida y no de la cantidad residual.
 - Aunque el efecto del nitrito añadido depende de diversos factores, se proponen como niveles suficientes para ejercer un adecuado efecto antimicrobiano 50-100 mg/kg para la mayoría de productos y hasta 150 mg/kg para productos crudos.
 - Se propone que en la legislación se sustituya el término “cantidad añadida indicativa” por “cantidad máxima permitida”.

Como resultado del informe de la EFSA, la Comisión Europea publicó la Directiva 2006/52/CE, transpuesta en España mediante el Real Decreto 1118/2007 (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007). En esta nueva norma se establecieron como cantidades máximas permitidas para la elaboración de productos cárnicos curados fermentados 150 mg/kg de nitrato y 150 mg/kg de nitrito, o 250 mg/kg de nitrato en los productos de larga curación si no se añade nitrito. En el jamón curado y productos similares se permitían unas “dosis residuales máximas” de 250 mg/kg para el nitrato y de 100 mg/kg para el nitrito.

A pesar de estos cambios en la normativa comunitaria, en el año 2007 las autoridades danesas notificaron a la Comisión su intención de no transponer la Directiva 2006/52/CE a su ordenamiento jurídico y mantener sus disposiciones nacionales en materia de nitritos, alegando que eran más restrictivas que las de la nueva Directiva y, por ello, más seguras para evitar la formación de nitrosaminas. Dinamarca subrayó que sus disposiciones nacionales llevaban muchos años en vigor, sin que nunca se hubieran producido problemas de conservación de los productos en cuestión y sin que se hubieran presentado casos de botulismo desde 1980. Así pues, en 2010 la Comisión publicó la Decisión 2010/561/UE en la que se permitía a Dinamarca mantener su propia legislación hasta mayo de 2015 (Comisión Europea, 2010a). Durante este periodo, Dinamarca debía recoger datos y notificarlos a la Comisión para verificar si con la aplicación de los niveles establecidos en la Directiva

2006/52/CE se alcanzaría el nivel requerido de protección y si, de no ser así, se produciría un riesgo inaceptable para la salud humana. Al mismo tiempo, la Comisión tenía que supervisar la aplicación de la Directiva 2006/52/CE en los Estados miembros, en particular en cuanto al uso de nitritos por la industria en las diversas categorías de productos cárnicos.

A finales de 2014 Dinamarca solicitó nuevamente a la Comisión mantener sus disposiciones nacionales sobre la adición de nitritos. Para ello aportó un informe con datos sobre consumo de productos cárnicos, exposición a nitritos, prevalencia del botulismo y formación de nitrosaminas en productos cárnicos elaborados. En mayo de 2015 la Comisión otorgó tres años más a Dinamarca (hasta el 22 de mayo de 2018) para que durante este tiempo pueda seguir aplicando sus disposiciones nacionales en materia de nitritos, mientras continúa recogiendo datos para realizar un seguimiento de la situación (Comisión Europea, 2015).

Por otra parte, de acuerdo con la Decisión 2010/561/UE, en 2014 la Comisión presentó un estudio sobre la aplicación de las normas de la UE relativas a los nitritos en los distintos Estados miembros. En él se puso de manifiesto que, en general, la cantidad de nitritos añadida a los productos cárnicos crudos es inferior a la máxima establecida por la UE, aunque superior a los niveles daneses, y se concluía que debía examinarse más en detalle la posibilidad de revisar los actuales niveles máximos de nitritos. Anteriormente, en 2010, ya se había publicado el Reglamento UE 257/2010 en el que se establecía la necesidad de reevaluar distintos aditivos alimentarios autorizados, entre ellos los nitratos y nitritos.

En lo que a EEUU se refiere, el uso de nitratos y nitritos en los productos cárnicos curados actualmente está regulado tanto por la *Food and Drug Administration* (FDA) como por el *United States Department of Agriculture* (USDA). La primera de las agencias únicamente establece los niveles residuales máximos de nitrato y nitrito en el producto final, que se limitan a 500 mg/kg y 200 mg/kg, respectivamente (FDA, 2005). Por su parte, el USDA estipula tanto la cantidad máxima de nitrato y nitrito que se puede añadir para la elaboración de los productos curados según el método de curado empleado (**Tabla I.9**), como el nitrito residual en el producto final, que no debe superar

los 200 mg/kg con independencia de la adición de nitrato, nitrito o la combinación de ambos (USDA, 1995).

Tabla I.9.
Niveles máximos de nitrato y nitrito permitidos (mg/kg) para su incorporación a los productos curados en función del método empleado.

Agente de curado	Método de curado			
	Inmersión	Masaje o inyección	Mezcla	Frotamiento
Nitrito sódico	200	200	156	625
Nitrito potásico	200	200	156	625
Nitrato sódico	700	700	1.718	2.187
Nitrato potásico	700	700	1.718	2.187

Fuente: USDA (1995).

Además, el USDA establece un nivel mínimo de 120 mg/kg de nitrito para aquellos productos que requieran de refrigeración para su conservación. En los productos en los que, por haber sufrido un tratamiento térmico completo o por la combinación de un pH, humedad y envasado apropiados, se pueda asegurar su estabilidad durante el almacenamiento, como son los embutidos fermentados, no se establece un nivel de nitrito mínimo para su elaboración. No obstante, se recomienda una concentración mínima de nitrito de 40 mg/kg tanto por su efecto conservante como por su influencia en la fijación del color (USDA, 1995).

5. Referencias

- An, H., Zhou, H., Huang, Y., Wang, G., Luan, C., Mou, J., *et al.* (2010). High-level expression of heme-dependent catalase gene *kat A* from *Lactobacillus sakei* protects *Lactobacillus rhamnosus* from oxidative stress. *Molecular Biotechnology*, 45, 155–160.
- Andritsos, N. D., Mataragas, M., Mavrou, E., Stamatiou, A., y Drosinos, E. H. (2012). The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. *Meat Science*, 91, 486–489.
- ANICE, 2015. El sector cárnico. Disponible en: http://www.anice.es/v_portal/informacion/informacionver.asp?cod=9776&te=7&idag e=11909&vap=0&npag=1. Consultado el 10 de junio de 2015.
- Aureli, P., Franciosa, G., y Fenicia, L. (2002). Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *The Pediatric Infectious*

- Disease Journal*, 21, 866-868.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En S. Salminen, A. Ouwehand, y A. Von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp. 1-66). Nueva York: Marcel Dekker.
- Bakshi, S. P., Fahey, J. L., y Pierce, L. E. (1967). Brief recording: sausage cyanosis-acquired methemoglobinemic nitrite poisoning. *The New England Journal of Medicine*, 277, 1072.
- Barynin, V. V., Whittaker, M. M., Antonyuk, S. V., Lamzin, V. S., Harrison, P. M., Artymiuk, P. J., et al. (2001). Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Structure*, 9, 725-38.
- Bell, C., y Kyriakides, A. (2002). *Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods*. Oxford: Blackwell Science.
- Benjamin, N., y Collins, J. (2012). Nitrite. En N. J. Russell y G. W. Gould (Eds.), *Food preservatives* (pp. 102-118). Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Berdagué, J. L., Monteil, P., Montel, M. C., y Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, 35, 275-287.
- Berends, B. R., Van Knapen, F., Mossel, D. A. A., Burt, S. A., y Snijders, J. M. A. (1998). Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 219-229.
- Brooks, J., Haines, R. B., Moran, T., y Pace, J. (1940). *The function of nitrate, nitrite and bacteria in the curing of bacon and hams*. Londres: Department of Scientific and Industrial Research, Food Investigation Board Special Report nº 49. His Majesty's Stationery Office.
- Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Torres Martinez, C., Maraj, S. R., y Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411, 475-488.
- Campillo, N., Viñas, P., Martínez-Castillo, N., y Hernández-Córdoba, M. (2011). Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1815-21.
- Carlsen, C. U., Møller, J. K. S., y Skibsted, L. H. (2005). Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 485-498.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M. C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A. M., Dudez, A. M., Martin, V., et al. (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology*, 23, 1527-1533.
- Chan, T. Y. (1996). Food-borne nitrates and nitrites as a cause of methemoglobinemia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 27, 189-192.
- Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E., et al. (2006). Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control*, 17, 446-453.
- Cocconcilli, P. S., y Fontana, C. (2010). Starter cultures for meat fermentation. En F. Todrá (Ed.), *Handbook of meat processing* (pp. 199-218). Ames: Wiley-Blackwell.
- Collins, M. D., y East, A. K. (1998). Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 5-17.
- Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., et al. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, 69, 381-392.
- Comisión de las Comunidades Europeas. (2001). Informe de la comisión sobre la ingesta de aditivos alimentarios en la Unión

- Europea. COM, 542, 1–32.
- Comisión de las Comunidades Europeas. (2005). Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L338, 1–26.
- Comisión Europea. (2007). Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de Unión Europea*, L322, 12–29.
- Comisión Europea. (2008). Reglamento (CE) n° 889/2008 de la Comisión de 5 de septiembre de 2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L250, 1–84.
- Comisión Europea. (2010a). Decisión de la Comisión de 25 de mayo de 2010 relativa a las disposiciones nacionales notificadas por Dinamarca sobre la adición de nitritos a determinados productos cárnicos. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L247, 55–65.
- Comisión Europea. (2010b). Reglamento (UE) n° 257/2010 de la Comisión de 25 de marzo 2010 por el que se establece un programa para la reevaluación de aditivos alimentarios autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L80, 19–27.
- Comisión Europea. (2010c). Reglamento (UE) n° 365/2010 de la Comisión de 28 de abril de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriáceas en la leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L107, 9–11.
- Comisión Europea. (2011). Reglamento (UE) n° 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L295, 1–177.
- Comisión Europea. (2015). Decisión (UE) 2015/826 de la comisión de 22 de mayo de 2015 relativa a las disposiciones nacionales notificadas por Dinamarca sobre la adición de nitritos a determinados productos cárnicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L130, 10–18.
- Crews, C. (2010). The determination of N-nitrosamines in food. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2, 2–12.
- Davidson, P. M., Juneja, V. K., y Branen, J. K. (2002). Antimicrobial agents. En A. L. Branen, P. M. Davidson, S. Salminen, y J. H. Thorngate (Eds.), *Food additives* (pp. 563–620). Nueva York: Marcel Dekker.
- De Bruyne, K., Franz, C. M. A. P., Vancanneyt, M., Schillinger, U., Mozzi, F., de Valdez, G. F., et al. (2008). *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by pheS, rpoA and atpA sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2909–2916.
- De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M. C., et al. (2014). The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Science*, 96, 821–828.
- Deierling, H., Hemmrich, U., Groth, N., y Taschan, H. (1997). Nitrosamine in Lebensmitteln. *Lebensmittel-chemie*, 51, 53–61.
- Domanska, K., y Kowalski, B. (2003). Occur-

- ence of volatile N-nitrosamines in Polish processed meat products. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 47, 507–514.
- Dorner, M. B., Schulz, K. M., Kull, S., y Dorner, B. G. (2013). Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. En A. Rummel y T. Binz (Eds.), *Botulinum neurotoxins: current topics in microbiology and immunology* (pp. 219–256). Nueva York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., Kowalska, T., Paelinck, H., y Vander Heyden, Y. (2011). Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*, 126, 1539–1545.
- Drabik-Markiewicz, G., Van den Maagdenberg, K., De Mey, E., Deprez, S., Kowalska, T., y Paelinck, H. (2009). Role of proline and hydroxyproline in N-nitrosamine formation during heating in cured meat. *Meat Science*, 81, 479–486.
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., y Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69, 307–317.
- Dunkel, V. C., Rogers-Back, A. M., Lawlor, T. E., Harbell, J. W., y Cameron, T. P. (1989). Mutagenicity of some alkyl nitrites used as recreational drugs. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 14, 115–122.
- Dykhuisen, R. S., Frazer, R., Duncan, C., Smith, C. C., Golden, M., Benjamin, N., et al. (1996). Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: importance of dietary nitrate in host defense. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1422–1425.
- ECDC. (2014). *Annual epidemiological report 2014: food- and waterborne diseases and zoonoses*. Stockholm: ECDC.
- EFSA. (2003). Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the Commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *The EFSA Journal*, 14, 1–31.
- EFSA. (2012). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *The EFSA Journal*, 10, 1–442.
- EFSA. (2014). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *The EFSA Journal*, 12, 1–312.
- Ege, S. N. (2004). *Organic chemistry: structure and reactivity*. Houghton Mifflin Company.
- Engemann, A., Focke, C., y Humpf, H. U. (2013). Intestinal formation of N-nitroso compounds in the pig cecum model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 998–1005.
- EURL-Lm. (2014). Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *EURL Lm-ANSES*, 1–47.
- Fang, F. C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 99, 2818–2825.
- FAO/WHO. (2002). Evaluation of certain food additives: fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, 913, 1–161.
- FAO/WHO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series*, 4, 1–48.
- Farber, J. M., y Peterkin, P. I. (2000). *Listeria monocytogenes*. En B. Lund, A. C. Baird-Parker, y G. W. Gould (Eds.), *Microbiological safety and quality of food*. Vol. 3 (pp. 1178–1231). Gaithersburg: Aspen.
- FDA. (2005). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption (Title 21, Volume 3, 21CFR172.170 and 172.175). *Code of Federal Regula-*

- tions.
- FDA. (2008). Guidance for industry: control of *Listeria monocytogenes* in refrigerated or frozen ready-to-eat foods; draft guidance. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/FoodProcessingHACCP/ucm073110.htm>. Consultado el 1 de junio de 2015.
- Fedorka-Cray, P. J., y Wray, C. (2000). *Salmonella* infections in pigs. En C. Wray y A. Wray (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (pp. 191–207). Londres: CAB Intern.
- Fiddler, W., Pensabene, J. W., Gates, R. A., y Adam, R. (1998). Nitrosamine formation in processed hams as related to reformulated elastic rubber netting. *Journal of Food Science*, 63, 276–278.
- Fiddler, W., Pensabene, J. W., Piotrowski, E. G., Phillips, J. G., Keating, J., Mergens, W. J., et al. (1978). Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by the use of cure-solubilized alpha-tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 65365–65366.
- Fink-Gremmels, J., El-Banna, A. A., y Leistner, L. (1988). Developing mold starter cultures for meat products. *Fleischwirtschaft*, 68, 1292–1294.
- Flores, M., y Toldrá, F. (1993). Curing: Process and applications. En R. Macrae, R. Robinson, M. Sadle, y G. Fullerlove (Eds.), *Encyclopaedia of food science, food technology, and nutrition* (p. 5365). Londres: Academic Press.
- Froehlich, D. A., Gullett, E. A., y Usborne, W. R. (1983). Effect of nitrite and salt on the color, flavor and overall acceptability of ham. *Journal of Food Science*, 48, 152–154.
- Gavinelli, M., Fanelli, R., Bonfanti, M., Davoli, E., y Airoldi, L. (1988). Volatile nitrosamines in foods and beverages: preliminary survey of the Italian market. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 40, 41–46.
- Geisen, R., Lücke, F. K., y Kröckel, L. (1992). Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft*, 72, 894–898.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., y König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 1019–1025.
- Gibson, A. M., y Roberts, T. A. (1986). The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonellae* in a laboratory medium. *International Journal of Food Microbiology*, 3, 183–194.
- Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P., Hogg, N., Shiva, S., et al. (2005). The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology*, 1, 308–314.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., y Møller, J. K. S. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 303–310.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., y Møller, J. K. S. (2008). Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Science*, 78, 492–501.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechāi, F., Mamzer-Bruneel, M. F., et al. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 136–138.
- Hammes, W. P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*, 29, 151–156.
- Hammes, W. P., y Hertel, C. (1998). New

- developments in meat starter cultures. *Meat Science*, 49, 125–138.
- Hammes, W. P., y Knauf, H. J. (1994). Starters in the processing of meat products. *Meat Science*, 36, 155–168.
- Hammes, W. P., Rolz, I., y Bantleon, A. (1985). Microbiological examination of starter culture preparations available on the german market for the production of dry sausage. *Fleischwirtschaft*, 65, 629–636.
- Hartmann, S., Wolf, G., y Hammes, W. P. (1995). Reduction of nitrite by *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 323–328.
- Hauschild, A. H. W. (1989). *Clostridium botulinum*. En M. P. Doyle (Ed.), *Foodborne bacterial pathogens* (pp. 112–189). Nueva York: Marcel Dekker.
- Hecht, S. S. (1997). Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. En *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* (pp. 181–191). Nueva York.
- Helmick, J. S., y Fiddler, W. (1994). Thermal decomposition of the rubber vulcanization agent, zinc dibenzylthiocarbamate, and its potential role in nitrosamine formation in hams processed in elastic nettings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2541–2544.
- Herrmann, S. S., Duedahl-Olesen, L., y Granby, K. (2015). Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control*, 48, 163–169.
- Hierro, E., Fernández, M., De la Hoz, L., y Ordóñez, J. A. (2014). Mediterranean products. En F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 301–312). Ames: Wiley-Blackwell.
- Hill, M. J. (1988). *Nitrosamines: Toxicology and Microbiology*. Chichester: Ellis Horwood Series in Food Science and Technology.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68–76.
- Honikel, K. O. (2010). Curing. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of meat processing* (pp. 125–141). Ames: Wiley-Blackwell.
- Hu, T. M., y Chen, Y. J. (2010). Nitrosation-modulating effect of ascorbate in a model dynamic system of coexisting nitric oxide and superoxide. *Free Radical Research*, 44, 552–562.
- Iammarino, M., Di Taranto, A., y Cristino, M. (2013). Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring. *Food Chemistry*, 140, 763–771.
- Ingram, M. (1974). The microbiological effects of nitrite. En B. Kroll y B. J. Tinbergen (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat Products* (pp. 63–75). Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- Jackson, A. L., Sullivan, G. A., Kulchaiyawat, C., Sebranek, J. G., y Dickson, J. S. (2011). Survival and growth of *Clostridium perfringens* in commercial no-nitrate-or-nitrite-added (natural and organic) frankfurters, hams, and bacon. *Journal of Food Protection*, 74, 410–416.
- Jain, M. D., y Nikonova, A. (2013). Methemoglobinemia from curing salt. *Canadian Medical Association Journal*, 185, 771.
- Jakszyn, P., Agudo, A., Ibáñez, R., García-Closas, R., Pera, G., Amiano, P., y *et al.* (2004). Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Journal of Nutrition*, 134, 2011–2014.
- Jansson, E. A., Huang, L., Malkey, R., Govoni, M., Nihlén, C., Olsson, A., *et al.* (2008). A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nature Chemical Biology*, 4, 411–417.

- Johnson, E. A. (2013). *Clostridium botulinum*. En M. P. Doyle y R. L. Buchanan (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (pp. 288–304). Whashington: ASM Press.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224.
- Kandler, O., y Weiss, N. (1989). *Lactobacillus*. En P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, y J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (p. 1209). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kanner, J., Harel, S., y Rina, G. (1991). Nitric oxide as an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 289, 130–136.
- Kanner, J., Harel, S., Shagalovich, J., y Berman, S. (1984). Antioxidative effect of nitrite in cured meat products: nitric oxide-iron complexes of low molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 512–515.
- Kennedy, N., Smith, C. P., y McWhinney, P. (1997). Faulty sausage production causing methaemoglobinaemia. *Archives of Disease in Childhood*, 76, 367–368.
- Khan, A., Adams, A., Simmons, G., y Sutton, T. (2006). Deadly meatballs - a near fatal case of methaemoglobinaemia. *The New Zealand Medical Journal*, 119, 66–68.
- Kingsley, R. A., y Bäuml, A. J. (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Molecular Microbiology*, 36, 1006–1014.
- Krause, B. L., Sebranek, J. G., Rust, R. E., y Mendonca, A. (2011). Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked and sliced ham. *Meat Science*, 89, 507–513.
- Lathia, D., y Blum, A. (1989). Role of vitamin E as nitrite scavenger and N-nitrosamine inhibitor: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 59, 430–438.
- Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J. P., Bover-Cid, S., et al. (2007). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*, 76, 112–122.
- Leistner, L. (1995). Stable and safe fermented sausages world-wide. En G. Campbell-Platt y P. E. Cook (Eds.), *Fermented meats* (pp. 160–175). Londres: Blackie Academic & Professional.
- Leroy, F., Verluut, J., y De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270–285.
- Lücke, F. K. (1998). Fermented sausages. En B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods* (pp. 441–483). Londres: Blackie Academic & Professional.
- Lücke, F. K. (2000). Fermented meats. En B. Lund, T. C. Baird-Parker, y G. W. Gould (Eds.), *Microbiological safety and quality of food. Vol. 1* (pp. 420–444). Gaithersburg, Meriland: Aspen.
- Lücke, F. K., y Hechelmann, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham composition and effect. *Fleischwirtschaft*, 67, 307–314.
- Lücke, F. K., y Roberts, T. A. (1993). Control in meat and meat products. En A. H. W. Hauschild y K. L. Dodds (Eds.), *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods* (pp. 177–207). Nueva York: Marcel Dekker.
- Lund, B. M., y Peck, M. W. (2000). *Clostridium botulinum*. En B. M. Lund, A. C. Baird-Parker, y G. W. Gould (Eds.), *The microbiological safety and quality of food* (pp. 1057–1109). Gaithersburg: Aspen.
- Lundberg, J. O., Carlström, M., Larsen, F. J., y Weitzberg, E. (2011). Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovascular Research*, 89, 525–532.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Cole, J. A., y

- Benjamin, N. (2004). Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews. Microbiology*, 2, 593–602.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., y Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7, 156–167.
- Mac Donald, B., Gray, J. I., y Gibbins, L. N. (1980). Role of nitrite in cured meat flavor: antioxidant role of nitrite. *Journal of Food Science*, 45, 893–897.
- Magrinyà, N., Bou, R., Rius, N., Codony, R., y Guardiola, F. (2012). Effect of fermentation time and vegetable concentrate addition on quality parameters of organic Botifarra Catalana, a cured-cooked sausage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6882–6890.
- Magrinyà, N., Bou, R., Tres, A., Rius, N., Codony, R., y Guardiola, F. (2009). Effect of tocopherol extract, *Staphylococcus carnosus* culture, and celery concentrate addition on quality parameters of organic and conventional dry-cured sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8963–8972.
- Maguire, H. C., Codd, A. A., Mackay, V. E., Rowe, B., y Mitchell, E. (1993). A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. *Epidemiology and Infection*, 110, 239–246.
- Marco, A., Navarro, J. L., y Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*, 73, 660–673.
- Marco, A., Navarro, J. L., y Flores, M. (2008). The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *European Food Research and Technology*, 226, 449–458.
- Martínez, A., Haza, A. I., y Morales, P. (2000). N-nitrosaminas en los alimentos y riesgo para la salud (I). *Alimentación, Equipos Y Tecnología*, 7, 153–158.
- Massey, R. C., Key, P. E., Jones, R. A., y Logan, G. L. (1991). Volatile, non-volatile and total N-nitroso compounds in bacon. *Food Additives and Contaminants*, 8, 585–598.
- Massey, R. C., Key, P. E., Mallett, A. K., y Rowland, I. R. (1988). An investigation of the endogenous formation of apparent total N-nitroso compounds in conventional microflora and germ-free rats. *Food and Chemical Toxicology*, 26, 595–600.
- Ministerio de la Presidencia. (2014). Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. *Boletín Oficial del Estado*, 147, 46058–46078.
- Ministerio de Sanidad Danés. (1995). Sundhedsministeriets bekendtgørelse nr. 1055 af 18.12.1995 om tilsætningsstoffer til levnedsmidler. Sundhedsmin., j.nr. 95-3400-24. Levnedsmiddelstyrelsen, j.nr. 100-0066. Lovtidende A hæfte 198 udgivet den 30.12.1995 s. 5571. GBK.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (1997). Real Decreto 145/1997 de 31 de enero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín Oficial del Estado*, 70, 9378–9418.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2002). Real Decreto 142/2002 por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín Oficial del Estado*, 44, 6756–6799.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2007). Real Decreto 1118/2007 por el que se modifica el Real Decreto 142/2002 por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín Oficial del Estado*, 221, 37533–37544.

- Miralles, M. C., Flores, J., y Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology*, 13, 227–236.
- Miranda, K. M., Paolocci, N., Katori, T., Thomas, D. D., Ford, E., Bartberger, M. D., et al. (2003). A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9196–9201.
- Mirvish, S. S. (1975). Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 31, 325–351.
- Møller, J. K. S., y Skibsted, L. H. (2002). Nitric oxide and myoglobins. *Chemical Reviews*, 102, 1167–1178.
- Møretrø, T., y Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1, 107–121.
- Morita, H., Yoshikawa, H., Suzuki, T., Hisamatsu, S., Kato, Y., Sakata, R., et al. (2004). Anti-microbial action against verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 of nitric oxide derived from sodium nitrite. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68, 1027–1034.
- Mottram, D. S., Croft, S. E., y Patterson, R. L. S. (1984). Volatile components of cured and uncured pork: The role of nitrite and the formation of nitrogen compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 233–239.
- Mottram, D. S., y Rhodes, D. N. (1974). Nitrite and the flavour of cured meat. En B. Krol y B. J. Tinbergen (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat Products* (pp. 161–171). Wageningen: Wageningen Centre for the Agricultural Publishing and Documentation.
- Nakase, T., y Suzuki, M. (1985). Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij and related species. I. Chemotaxonomic investigations. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31, 49–69.
- Noel, P., Briand, E., y Dumont, J. P. (1990). Role of nitrite in flavour development in uncooked cured meat products: Sensory assessment. *Meat Science*, 28, 1–8.
- Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., et al. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97, 906–916.
- Núñez, M., (2014). Micrococcus. En C. A. Batt y M.-L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. II (pp. 627-633). Londres: Academic Press.
- Olesen, P. T., Meyer, A. S., y Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavour compounds in fermented sausages - The influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, 66, 675–687.
- Österdahl, B. G. (1988). Volatile nitrosamines in foods on the Swedish market and estimation of their daily intake. *Food Additives and Contaminants*, 5, 587–595.
- Ozel, M. Z., Gogus, F., Yagci, S., Hamilton, J. F., y Lewis, A. C. (2010). Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3268–3273.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., y Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859–867.
- Parlamento Europeo y del Consejo. (1995). Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. *Diario Oficial*, L61, 1–56.

- Parlamento Europeo y del Consejo. (2006). Directiva 2006/52/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de julio de 2006 por la que se modifica la Directiva 95/2/CE relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes y la Directiva 94/35/CE relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L204, 10–22.
- Peck, M. W. (2006). *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: An emerging issue? *Journal of Applied Microbiology*, 101, 556–570.
- Peck, M. W., Stringer, S. C., y Carter, A. T. (2011). *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food Microbiology*, 28, 183–191.
- Pegg, R. B., y Shahidi, F. (2000). *Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*. Trumbull: Food & Nutrition Press.
- Pichner, R., Hechelmann, H., Gareis, M., y Steinruck, H. (2006). Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) in conventionally and organically produced salami products. *Fleischwirtschaft*, 86, 112–114.
- Richard, A. M., Diaz, J. H., y Kaye, A. D. (2014). Reexamining the risks of drinking-water nitrates on public health. *The Ochsner Journal*, 14, 392–398.
- Rosenstein, R., y Götz, F. (2010). Genomic differences between the food-grade *Staphylococcus carnosus* and pathogenic staphylococcal species. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 104–108.
- Rostkowska, K., Zwierz, K., Rózański, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., y Roszczenko, A. (1998). Formation and metabolism of N-nitrosamines. *Polish Journal of Environmental Studies*, 7, 321–325.
- Rowe, J. J., Yarbrough, J. M., Rake, J. B., y Eagon, R. G. (1979). Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, 2, 51–54.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., y García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, 19–27.
- Ruiz, M., Rodríguez, J. C., Escribano, I., y Royo, G. (2004). Available options in the management of non-typhi *Salmonella*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5, 1737–1743.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., y Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami - a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 69–82.
- Santamaria, P., Elia, A., Serio, F., y Todaro, E. (1999). A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1882–1888.
- Schrader, K. D., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Dickson, J. S., y Mendonca, A. F. (2009). Control of *Listeria monocytogenes* on no-nitrate-or-nitrite-added (natural or organic) frankfurters. *Animal Industry Report*, AS 655, AS.
- Schuddeboom, L. J. (1993). Nitrates and nitrites in foodstuffs. *Council of Europe Press*, 1–124.
- Sebranek, J. G., y Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77, 136–147.
- Sebranek, J. G., Jackson-Davis, A. L., Myers, K. L., y Lavieri, N. A. (2012). Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Science*, 92, 267–273.
- Shahmat, M., Seaman, A., y Woodbine, M. (1980). Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *L. monocytogenes*. En G. W. Gould y J. E. J. Corry (Eds.), *Microbial growth and survival in extremes of environment* (pp. 227–237). Nueva York: Academic Press.
- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G.,

- Love, J. A., y Ahn, D. U. (2007). Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science*, 72, 388–395.
- Skibsted, L. H. (1992). Cured meat products and their oxidative stability. En D. A. Ledward, D. E. Johnston y M. K. Knight (Eds.), *The chemistry of muscle based foods* (pp. 266–286). Londres: Royal Society of Chemistry.
- Skibsted, L. H. (2011). Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 24, 176–183.
- Søndergaard, A. K., y Stahnke, L. H. (2002). Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* - a comparative study in model systems. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 99–109.
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels - Part II. Volatile components. *Meat Science*, 41, 193–209.
- Suen, J. C., Hatheway, C. L., Steigerwalt, A. G., y Brenner, D. J. (1988). Genetic confirmation of identities of neurotoxicogenic *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* implicated as agents of infant botulism. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2191–2192.
- Tan, X., Liu, L., Liu, S., Yang, D., Liu, Y., Yang, S., et al. (2014). Genome of *Staphylococcus xylosus* and comparison with *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 41, 413–416.
- Terns, M. J., Milkowski, A. L., Claus, J. R., y Sindelar, J. J. (2011). Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*, 88, 454–461.
- Terns, M. J., Milkowski, A. L., Rankin, S. A., y Sindelar, J. J. (2011). Determining the impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*, 88, 311–318.
- Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L., y Martinussen, J. (2004). Growth and production of volatiles by *Staphylococcus carnosus* in dry sausages: Influence of inoculation level and ripening time. *Meat Science*, 67, 447–452.
- Toldrá, F. (2002). *Dry-cured meat products*. Trumbull: Food & Nutrition Press.
- Toldrá, F., Aristoy, M.-C., y Flores, M. (2009). Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development. *Grasas Y Aceites*, 60, 291–296.
- Tompkin, R. B. (1980). Botulism from meat and poultry products - A historical perspective. *Food Technology*, 34, 229–236.
- Tompkin, R. B., Christiansen, L. N., y Shaparis, A. B. (1978). The effect of iron on botulinal inhibition in perishable canned cured meat. *International Journal of Food Science & Technology*, 13, 521–527.
- Tsoukalas, D. S., Katsanidis, E., Marantidou, S., y Bloukas, J. G. (2011). Effect of freeze-dried leek powder (FDLP) and nitrite level on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 87, 140–145.
- USDA. (1922). *Regulations governing the meat inspection of the U.S. Department of Agriculture, Regulation 18: Section 6, Para. 2, Order 211 (issued December 2, 1922, effective November 1, 1922)*. Washington: Bureau of Animal Industry, U.S. Department of Agriculture.
- USDA. (1925). *Service and regulatory announcements, November (issued December 1925)*. Washington: Bureau of Animal Industry, U.S. Department of Agriculture.
- USDA. (1995). *Processing inspector's calculations handbook. FSIS Directive 7620.3*. Washington: Food Safety and Inspection

- Service, United States Department of Agriculture.
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., *et al.* (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125, 229–255.
- Vignolo, G., Fontana, C., y Fadda, S. (2010). *Handbook of meat processing*. (F. Toldrá, Ed.). Ames: Wiley-Blackwell.
- VLA/RIVM/Food-DTU. (2011). *Quantitative microbiological risk assessment on Salmonella in slaughter and breeder pigs. Final report*.
- Wakamatsu, J., Hayashi, N., Nishimura, T., y Hattori, A. (2010). Nitric oxide inhibits the formation of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX. *Meat Science*, 84, 125–128.
- Wakamatsu, J., Nishimura, T., y Hattori, A. (2004). A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Science*, 67, 95–100.
- Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., y Hattori, A. (2004). Establishment of a model experiment system to elucidate the mechanism by which Zn-protoporphyrin IX is formed in nitrite-free dry-cured ham. *Meat Science*, 68, 313–317.
- Wasserman, A. E. (1973). Nitrite and the flavor of cured meat. II. Discussion. En *Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat Products*. Wageningen: Zeist, Pudic.
- Wolf, G., Arendt, E. K., Pfähler, U., y Hammes, W. P. (1990). Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 323–329.
- Yarbrough, J. M., Rake, J. B., y Eagon, R. G. (1980). Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 831–834.
- Yurchenko, S., y Mölder, U. (2007). The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chemistry*, 100, 1713–1721.
- Zur Hausen, H. (2012). Red meat consumption and cancer: reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 130, 2475–2483.

II. Justificación y objetivos

II. Justificación y objetivos

La evolución de la industria cárnica para adaptarse a los hábitos de la sociedad del siglo XXI ha planteado nuevos problemas y necesidades, como el desarrollo de tecnologías de procesado mínimo, de nuevos productos de conveniencia y la modificación de la composición de los derivados cárnicos para obtener fórmulas más saludables. Para abordar estos retos, en el año 2007 se solicitó al Ministerio de Educación y Ciencia el proyecto de investigación “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” (CARNISENUSA), dentro del programa Consolider-Ingenio 2010. Este proyecto, integrado por investigadores de distintas universidades e institutos de ámbito nacional, y que fue finalmente concedido (CSD2007-00016), incluía cuatro subproyectos, uno de los cuales -NITRARED- tenía como objetivo estudiar el impacto de la disminución de la concentración de nitratos y nitritos en la seguridad, vida útil y propiedades sensoriales de los productos crudos curados tradicionales, teniendo en cuenta la implicación de estos aditivos en la formación de N-nitrosocompuestos tóxicos.

El subproyecto NITRARED englobaba nueve acciones distintas y los resultados de esta Tesis Doctoral derivan de las investigaciones realizadas en el marco de las siguientes acciones:

- Acción 5. Efecto de diferentes niveles de sales nitrificantes sobre el perfil de compuestos volátiles de productos cárnicos crudos curados.
- Acción 6. Efecto de los niveles de agentes nitrificantes en la microbiota típica de los productos cárnicos crudos curados y en la presencia de patógenos.

Como se ha mencionado en la Introducción, las reticencias de Dinamarca a la adopción de la legislación comunitaria referente a nitratos y nitritos han puesto sobre la mesa la posibilidad de una futura revisión de la misma. Una disminución del contenido de sales nitrificantes en los productos cárnicos curados podría tener consecuencias relevantes en su seguridad y calidad sensorial, lo que hace necesario llevar a cabo estudios rigurosos en condiciones reales para evaluar el impacto de dicha reducción.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1. Investigar el efecto de la disminución de la cantidad añadida de sales nitrificantes en la microbiota típica de embutidos crudos curados tradicionales.
2. Estudiar la seguridad microbiológica de embutidos crudos curados inoculados con distintos microorganismos patógenos y elaborados con distintas concentraciones de nitratos y nitritos (*challenge tests*).
3. Evaluar el efecto de la concentración de nitratos y nitritos en la fracción volátil de los embutidos crudos curados.

III. Plan de trabajo

III. Plan de trabajo

Para la consecución de los objetivos propuestos se elaboraron tres embutidos crudos curados distintos (chorizo, salchichón y fuet) con distintas concentraciones de nitrato/nitrito y cuyas condiciones de elaboración se detallan en la **Tabla III-1**.

Tabla III.1.

Condiciones de elaboración de los distintos embutidos crudos curados estudiados.

	Salchichón ¹		Chorizo		Fuet	
Ingredientes (%)	Magro de cerdo	60	Magro de cerdo	90	Magro de cerdo	60
	Panceta	40	Panceta	10	Panceta	40
	Lactosa	3	NaCl	2,4	NaCl	2,2
	NaCl	2,4	Agua	2	Pimienta	0,3
	Agua	1	Pimentón dulce	1,2	Dextrosa	0,1
	Dextrosa	0,5	Dextrosa	0,7		
	Pimienta	0,25	Pirofosfato ácido sódico	0,15		
Cultivos iniciadores	<i>L. plantarum</i> <i>S. xylosus</i> <i>S. carnosus</i>		<i>P. pentosaceus</i> <i>S. xylosus</i>		<i>P. candidum</i>	
Sales nitrificantes (mg/kg)	Para todos los productos se utilizaron las siguientes concentraciones: HN: 150 NO ₃ ⁻ + 150 NO ₂ ⁻ MN: 112,5 NO ₃ ⁻ + 112,5 NO ₂ ⁻ LN: 75 NO ₃ ⁻ + 75 NO ₂ ⁻ C (control): sin nitrificantes					
Ø Tripa (mm)	70		80		40	
Condiciones de maduración	48 h; 22 °C; 90% RH		24 h; 14-16 °C; 70-80% RH		6 d; 15 °C; 85% RH	
	24 h; 19 °C; 87% RH		48 h; 24-26 °C; 90% RH		14 d; 12 C; 75-80% RH	
	24 h; 15 °C; 83% RH		24 d; 12 °C; 75-80% RH			
	26 d; 12 °C; 80% RH					
Lugar de elaboración ²	Dpto. NBTA; IFR		IRTA		IFR	

¹ Para el ensayo de inoculación con *C. botulinum* se prepararon también salchichones sin cultivo iniciador.

² Dpto. NTBA: Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, UCM; IRTA: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (Monells); IFR: Institute of Food Research (Norwich).

Así, se fabricaron embutidos con 150 mg/kg de nitrato y de nitrito (cantidad máxima que permite la legislación europea), una reducción del 25% (112,5 mg/kg de cada uno) y una reducción del 50% (75 mg/kg de cada uno), así como un lote sin

nitrificantes (control). Además, se realizaron ensayos preliminares en carne picada con un 2,4% de NaCl y concentraciones de sales nitrificantes equivalentes a las añadidas a los embutidos.

Los productos cárnicos se prepararon en distintas instalaciones. Todos los embutidos preparados para los ensayos de inoculación de microorganismos patógenos se elaboraron en la Planta Piloto del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UCM, salvo los que se utilizaron para los estudios con *Clostridium botulinum*, que se fabricaron en el *Institute of Food Research* (IFR, Norwich, Reino Unido). El chorizo se elaboró en la Planta Piloto del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*, (IRTA, Monells), mientras que su muestreo y los distintos análisis se realizaron en la Facultad de Veterinaria (UCM). Para ello las piezas se envasaron en bolsas de plástico y se transportaron a la UCM en condiciones de refrigeración y en un plazo de 24 horas.

1. Estudios microbiológicos

Por una parte se determinó el efecto de la concentración de nitrato y nitrito en la microbiota típica. Para ello se realizaron recuentos en placa de distintos grupos microbianos en función del producto analizado: aerobios mesófilos totales, bacterias lácticas, cocos Gram-positivos catalasa-positivos, enterobacterias, clostridios sulfito-reductores, bacterias psicrotrofas y *Brochothrix thermosphacta*. Estos análisis están especialmente detallados en el Artículo 3 que se presenta en esta memoria, aunque el resto de trabajos publicados también incluyen estudios sobre la microbiota típica.

Los ensayos de inoculación (*challenge tests*) se llevaron a cabo con *Salmonella* Typhimurium, *Listeria innocua* (como subrogado de *Listeria monocytogenes*) y *C. botulinum* en productos elaborados con distintas concentraciones de sales nitrificantes. Para estos estudios se prepararon los correspondientes inóculos que se incorporaron a las distintas formulaciones antes de proceder al embutido. El efecto de la concentración de nitrificantes en estos patógenos se determinó mediante recuentos en placa en el caso de *Salmonella* y *Listeria*, mientras que en el caso de *C. botulinum*

se determinó la producción de toxina botulínica a lo largo del proceso de maduración mediante la técnica de ELISA sándwich.

La descripción detallada de los *challenge tests* y sus resultados se recogen en los Artículos 1, 2 y 4 de la presente memoria.

2. Determinación y cuantificación de los compuestos volátiles en chorizo y salchichón.

Dado que los nitratos y nitritos contribuyen de forma relevante al aroma de los productos cárnicos curados, se evaluó también el perfil de compuestos volátiles al final de la maduración de embutidos elaborados con las distintas concentraciones de nitrificantes establecidas. La fracción volátil se obtuvo mediante microextracción en fase sólida y los compuestos se identificaron y cuantificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Los detalles y resultados de estos análisis figuran en los Artículos 1 y 3 de esta memoria.

3. Estudios físico-químicos

De forma rutinaria y para controlar la evolución del proceso madurativo, se determinó el pH y la a_w de todos los productos. Los detalles y resultados de estos análisis se muestran en los cuatro artículos que integran esta memoria.

Adicionalmente se determinaron las concentraciones residuales de nitrato y nitrito durante la maduración. Estos estudios se realizaron en chorizo y se llevaron a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) mediante la técnica de *Flow Injection Analysis*. La descripción de estas investigaciones se muestran en el Artículo 3 de la presente memoria.

IV. Resultados

Artículo 1

**Survival of *Listeria innocua* in dry fermented
sausages and changes in the typical microbiota
and volatile profile as affected by the
concentration of nitrate and nitrite**

***International Journal of Food Microbiology* 2012, 153, 395-401**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite

Xavier F. Hospital, Eva Hierro *, Manuela Fernández

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Received 5 October 2011, Received in revised form 30 November 2011, Accepted 30 November 2011

Abstract

The involvement of nitrate and nitrite in the formation of N-nitrosamines in foods is a matter of great concern. This situation has led to revise the real amount of nitrate and nitrite needed in meat products to exert proper technological and safety activities, and also to extensive research to find alternatives to their use. The present study addresses the possibility of reducing the ingoing amounts of these additives below the legal limits established by the current European regulations. Different concentrations of nitrate and nitrite were tested on Spanish *salchichón*-type dry fermented sausages concerning their role in the microbiota and volatile profile. Sausages were manufactured with the maximum ingoing amounts established by the EU regulations (150 ppm NaNO_3 and 150 ppm NaNO_2), a 25% reduction and a 50% reduction; control sausages with no nitrate/nitrite addition were also prepared. The mixtures were inoculated with 5 log cfu/g of *Listeria innocua* as a surrogate for *Listeria monocytogenes*. *L. innocua* numbers in the final product were approximately 1.5 log cfu/g lower in the batch with the maximum nitrate/nitrite concentration when compared to 25 and 50% reduced batches, and about 2 log cfu/g in comparison to the control sausages. The final numbers of catalase-positive cocci were 1 log cfu/g higher in the 50% nitrate/nitrite reduced batch and 2 log cfu/g higher in the control sausages, compared to products manufactured with the maximum nitrate/nitrite concentration. This increase was related to a higher amount of volatile compounds derived from carbohydrate fermentation and amino acid degradation. Sausages with no addition of nitrate/nitrite showed higher amount of volatiles from lipid oxidation. *Enterobacteriaceae* counts reached detectable values (1–2 log cfu/g) in both nitrate/nitrite reduced sausages and in the control batch, while these organisms were not detected

in the batch with the maximum ingoing amount. Nitrate and nitrite exerted a significant effect on the typical microbiota of dry fermented sausages and effectively contributed to control *Listeria*. These considerations should be taken into account in view of a future restriction in the use of these curing additives.

Keywords: Nitrate; Nitrite; Dry fermented sausages; *Listeria*; Typical microbiota; Volatile profile

INTRODUCTION

Nitrate and nitrite are typical additives for the production of cured meat products, although their role in the microbiology and chemistry of these products was not established until the beginning of the 20th century. Nowadays it is well known that nitrate and nitrite contribute not only to colour but also to flavour (Flores and Bermell, 1996; Noel *et al.*, 1990). Several authors have shown that the sensory quality of nitrite containing products is higher than that of nitrite-free ones (Noel *et al.*, 1990; Sebranek and Bacus, 2007). These additives exert antioxidant activity, which can greatly influence aroma generation (Olesen *et al.*, 2004; Stahnke, 1995). Moreover, specific volatile compounds are formed during curing reactions (Sebranek and Bacus, 2007).

Nitrate and nitrite also exert antimicrobial effects related to the inhibition of spoilage and pathogenic bacteria such as *Clostridium botulinum* (EFSA, 2003; Sebranek and Bacus, 2007). Compounds such as HNO₂ and NO, deriving from the reduction of curing agents initiated by nitrate reducing bacteria present in meat, could be responsible for the antimicrobial effect through the inactivation of iron and sulfur dependent enzymes (Reddy *et al.*, 1983).

Listeria monocytogenes is an ubiquitous pathogenic organism that can survive in biofilms and resists diverse environmental conditions, such as low pH and high sodium chloride concentrations, which give *Listeria* great persistence in the processing environments (Vázquez-Villanueva *et al.*, 2010). It also survives and grows at typical refrigeration temperatures (Farber *et al.*, 1989; Farber and Peterkin, 1991). Contamination of meat may take place during slaughter and in the subsequent

processing (Fenlon *et al.*, 1996). According to EC Regulation 2073/2005 (European Commission, 2005) the growth of *L. monocytogenes* is not favoured in ready-to-eat foods with $\text{pH} \leq 4.4$ or $a_w \leq 0.92$, or $\text{pH} \leq 5.0$ and $a_w \leq 0.94$. For foods that accomplish these conditions, a food safety criterion of 100 cfu/g of *L. monocytogenes* along shelf-life has been established. Many Mediterranean-style dry fermented sausages could be included in these categories, although there is great variability depending on the local traditions that influence fermentation and ripening.

There is scarce epidemiological evidence of the involvement of fermented sausages in listeriosis outbreaks (FAO/WHO, 2004; Lücke, 1998). However, pH and a_w are often in the limit of the tolerance of *Listeria*. It is probable that other hurdles, such as mainly the addition of nitrate and nitrite, exert a combined effect on the inhibition of this organism in dry fermented sausages.

Despite the beneficial role of nitrate and nitrite in dry fermented products, there is great concern regarding the role of these additives in the formation of nitrosamines, which carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects are well documented (Hecht, 1997; Pegg and Shahidi, 2000; Sawamura *et al.*, 2005). For this reason, over the last decade the reduction in the use of nitrate and nitrite on food industry has been proposed. Different strategies are also being investigated to find alternatives to their use, which include the use of natural antimicrobials, plant extracts and changes in the processing techniques. However, some of these strategies are still far from a real implementation in the food industry and other, such as the use of plant extracts, involve the indirect addition of nitrate and nitrite to the product (Sebranek and Bacus, 2007).

In the European Union, nitrate and nitrite are currently regulated by European Directive 2006/52/EC (European Parliament, 2006), which amended former regulations in a more restrictive way, and limited the addition of nitrate and nitrite to dry fermented products to 150 ppm for each substance, or 250 ppm of nitrate in long-cured products when no nitrite is added. After the publication of this Directive, Denmark, which regulations on nitrite in meat products are more restrictive, communicated the decision to maintain their national regulations instead of adopting the European Directive 2006/52/EC. Through a Decision taken on May 25th 2010 (European Commission, 2010), the European Commission has given Denmark a five-year moratorium to collect

and report epidemiological data that support the safety of their products. Considering this situation one of the possible scenarios in 2015 would be the revision of the current levels of nitrate and nitrite allowed by the European regulations.

Reducing the concentration of nitrate and nitrite could affect not only safety but also the typical microbiota that greatly influences the quality of dry fermented sausages. Therefore, the aim of this study is to determine the effect of reducing the concentration of nitrate and nitrite on the survival of *Listeria*, as well as its impact on the typical microbiota and the volatile profile of dry fermented sausages.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Listeria innocua NCTC 11288 was used for direct inoculation in the challenge experiments in dry fermented sausages. The use of surrogate microorganisms is a valid approach when it is not possible to introduce pathogens into a processing facility (Institute of Food Technologists, 2003). *L. innocua* is often regarded as the non-pathogenic variant of *L. monocytogenes* and it is a useful surrogate in a variety of treatments, including radiation, heat, lactic acid, NaCl, and nitrite (Kamat and Nair, 1996). *Staphylococcus xylosum* CECT 237, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 and *Lactobacillus plantarum* CECT 220 were used as starter cultures. All the strains were obtained from the Spanish Collection of Type Cultures (CECT, Valencia, Spain).

The strains were stored at -20 °C in the appropriate cultivation broth containing 20% (v/v) glycerol. *L. innocua* and the two staphylococci were cultivated in Tryptone Soy Broth (TSB) and Tryptone Soy Agar (TSA) (Pronadisa, Madrid, Spain). *L. plantarum* was grown in pH 5.7 Man–Rogosa–Sharpe (MRS) broth and agar (Pronadisa).

Inoculum preparation

Cultures were prepared by inoculating a loop of frozen culture into 9 ml of the appropriate cultivation broth, then incubating at 37 °C for 24 h; subsequently, a 20 µl inoculum of the grown cultures was transferred to 10 ml broth and incubated under the same conditions. Afterwards, *L. innocua* and the two staphylococci were plated on TSA,

and lactobacilli were plated on MRS agar and incubated under the same conditions. For each organism, one colony was transferred into 10 ml of the appropriate broth and incubated at 37 °C to reach the stationary growth phase.

Sausage manufacture

Mediterranean-style dry fermented sausages (Spanish *salchichón*) were manufactured at the pilot plant at the Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Universidad Complutense de Madrid, Spain). Lean pork (60%) and pork back fat (30%) were chopped in a mincer (Garhe MR-9, Amorebieta, Spain) equipped with an adjustable plate set at a hole diameter of 6 mm. Afterwards, lactose (3%), NaCl (2.4%), dextrose (0.5%), ground black pepper (0.25%) and the bacterial cultures were added to the mixture. Cultures were formulated to reach an approximate concentration in the meat batter of 10^5 – 10^6 cfu/g for the starters and 10^5 cfu/g for *Listeria*. The proportion of the starters was 1:1:1.

The batter was then divided into 3 batches which were added with 150 ppm NaNO_3 and 150 ppm NaNO_2 (high nitrate/nitrite batch, HN); 112.5 ppm NaNO_3 and 112.5 ppm NaNO_2 (medium nitrate/nitrite batch, MN); 75 ppm NaNO_3 and 75 ppm NaNO_2 (low nitrate/nitrite batch, LN). A control batch with no nitrate/nitrite addition (C) was also prepared.

The mixtures were stuffed into 70 mm diameter collagen casings, resulting in sausages of approximately 200 g, which were then sprayed with 20% potassium sorbate. The sausages were fermented and dried for 30 days: 2 days at 22 °C and 90% relative humidity (RH), 24 h at 19 °C and 87% RH, 24 h at 15 °C and 83% RH, and 26 days at 12 °C and 80% RH.

Two sausages per batch were prepared at the same time for analysis of volatile compounds following the same formulation and above explained procedure, but with no inoculation of *L. innocua*.

The results reported in this study are the mean data obtained with samples from two independent manufacturing processes carried out with different ingredients but the same formulation and technology.

Microbial analysis

Ten-gram slices were aseptically taken and homogenized with 50 ml of saline solution (0.85% NaCl) for 2 min in a Stomacher 400 (Colworth, London, UK). Serial ten-fold dilutions were prepared from this homogenate.

Total viable counts were determined on Plate Count Agar (PCA) (Pronadisa) with 1% NaCl according to the recommendations by Dainty *et al.*, 1975, and incubated at 32 °C for 48 h; lactic acid bacteria were plated on double layer MRS agar at pH 5.5 and incubated at 32 °C for 48 h; Gram positive catalase-positive cocci were enumerated on Manitol-Salt Agar (MSA) (Pronadisa) at 32 °C for 48 h, and *Enterobacteriaceae* on double layer Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Pronadisa) incubated at 37 °C for 24 h. For the enumeration of sulphite-reducing clostridia, 1 ml of the corresponding dilution was heated at 100 °C for 2 min and then inoculated in tubes containing Sulphite–Polymyxin–Sulfadiazine (SPS) melted agar (Pronadisa). To maintain anaerobic conditions, an overlay of sterile paraffin was added before incubating the tubes at 37 °C for 24 h. *L. innocua* was determined on PALCAM (polymyxin, acriflavin, lithium clorure, ceftazidime, esculin, mannitol) agar (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) after incubation at 37 °C for 48 h. The results were expressed in colony forming units/gram.

Physico-chemical analysis

Measurement of pH was done in a homogenate prepared with an aliquot of sausage (4 g) and distilled water (10 ml), using a Crison 2001 pH meter (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain). Water activity (a_w) values were obtained at 25 °C from a 2 mm thick sausage slice using a dew point hygrometer Decagon CX-1 (Decagon Devices, Pullman, Washington, USA). Moisture content was determined by dehydration at 100 °C until constant weight according to AOAC (2006).

Microbial and physical analyses were performed at days 0, 3, 7, 15 and 30 of ripening. The analyses were done in duplicate.

Volatile compound analysis

Extraction of headspace volatile compounds was done using a solid phase microextraction (SPME) device containing a fused silica fiber (10 mm length) coated with an 85 μm carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Samples were ground with a commercial grinder and 4 g was transferred to a 15ml vial, sealed with a PTFE faced silicone septum (Supelco). The vial was left for 30min in a thermoblock (Bibby Sterilin Ltd., Stone, Staffordshire, UK) at 40 °C for equilibration. The SPME fiber was then exposed to the headspace for 30min while maintaining the sample at 40 °C.

The compounds adsorbed by the fiber were desorbed in the injection port of a gas chromatograph Agilent 6850 (Agilent Tech., Santa Clara, USA) fitted with a mass spectrometer Agilent 5975C with triple-axis detector (Agilent Tech.). Helium was used as carrier gas with a linear velocity of 1 ml/min. During desorption, the injection port, held at 250 °C, was in splitless mode. The compounds were separated using a 5MS/silphenylene polysiloxane fused silica capillary column (60 m \times 0.25 mm i.d., 1 μm film thickness, Quadrex Corporation, Woodbridge, CT, USA). The GC oven temperature was started at 40 °C and held for 3 min; then the temperature was increased to 280 °C at a rate of 4 °C/min and held for 5 min. The compounds were electron bombarded (70 eV electronic impact) in the mass spectrometer obtaining the corresponding mass spectra. A series of n-alkanes (C₆–C₂₂) (Sigma) was analysed under the same conditions to obtain linear retention index (LRI) values for the components.

Compounds were identified by first comparing their mass spectra with those contained in the mass spectral database NIST'05 and then comparing the LRI values with either those of authentic standards or with published values (Kondjoyan and Berdagué, 1996; Rychlik *et al.*, 1998). The results were expressed in area units (AU). Analyses were performed in duplicate.

Statistical analysis

Statgraphics Plus version 5.0 (Manugistics, MD, USA) was used for statistical analysis. The effect of the concentration of nitrate/nitrite was assessed by a one-way ANOVA test.

RESULTS

Changes in the physico-chemical parameters

Figure 1 shows pH and a_w of the different batches of sausages during ripening. Final pH values were approximately 4.8, which allowed a correct texture development in the product. In relation to a_w , initial values (0.95) fell to approximately 0.86–0.87 in the final product. The final moisture content was 32–34% (data not shown). For all these parameters, no significant differences ($P>0.05$) were found among batches.

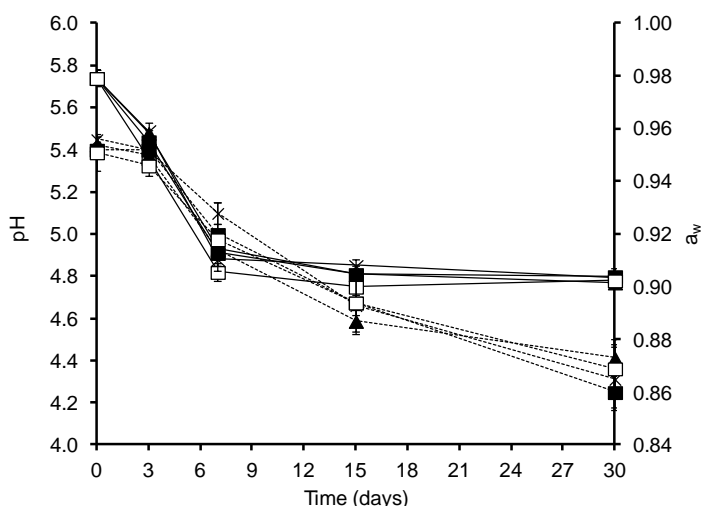


Figure 1. pH (—) and a_w (---) of dry fermented sausages prepared with different concentrations of nitrate/nitrite (■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite) during the ripening process. Values are the mean of two independent experiments and bars represent the standard error of the mean.

Changes in the typical microbiota

Total viable counts and lactic acid bacteria (LAB), as the main microbial group in dry fermented sausages, rapidly increased during the fermentation stage, from initial levels of 10^6 cfu/g to 10^9 cfu/g at day 3 in all batches (**Figure 2**). These counts remained constant until the end of ripening and no differences were shown due to the concentration of nitrate/nitrite.

Initial levels of Gram-positive catalase-positive cocci were 10^6 cfu/g in all batches (**Figure 2**). Final counts were 10^4 – 10^7 cfu/g depending on the batch. A significant ($P<0.05$) effect of the nitrate/nitrite concentration on this microbial group was reflected in sausages with the lowest concentration of preservatives (LN) and the control batch (C). These products showed higher final counts, approximately 1–2 log cfu/g, in comparison with batches MN and HN.

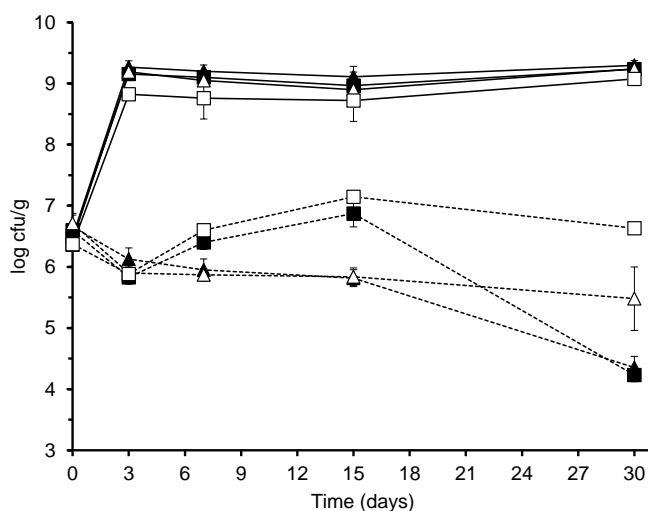


Figure 2. Changes in lactic acid bacteria (—) and Gram-positive catalase-positive cocci (---) counts during ripening of dry fermented sausages (■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; batch LN, △ low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite) during the ripening process. Values are the mean of two independent experiments and bars represent the standard error of the mean.

Enterobacteriaceae accounted for approximately 3 log cfu/g in the batter (**Figure 3**). During the first days of the process, counts slightly increased in batches C and LN before initiating a slow decline until the end of the ripening. This decreasing trend was observed in batches MN and HN from the beginning of the process. Significant differences ($P<0.05$) were found in the final counts due to the different nitrate/nitrite concentration. Thus, while no *Enterobacteriaceae* were detected in batch HN in the final

product, counts about 1 log cfu/g were found in batches LN and MN. In the absence of nitrate/nitrite, final counts of *Enterobacteriaceae* reached 2 log cfu/g.

The numbers of sulphite-reducing clostridia during ripening were below the limit of detection (<1 log cfu/g) in all batches.

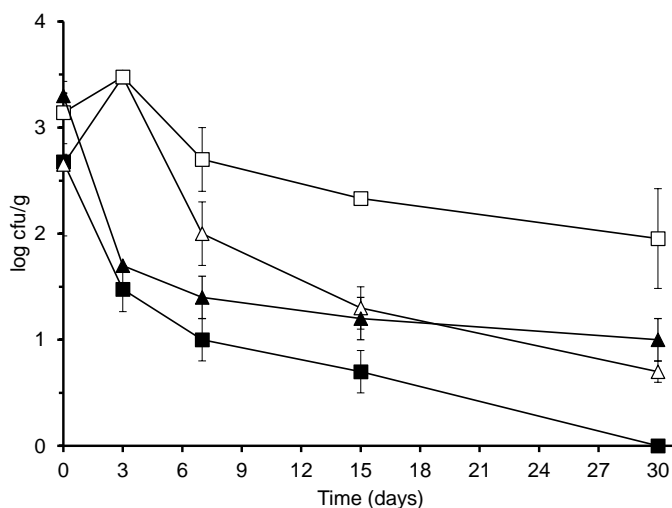


Figure 3. Changes in *Enterobacteriaceae* counts during ripening of dry fermented sausages (■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; batch LN, △ low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite) during the ripening process. Values are the mean of two independent experiments and bars represent the standard error of the mean.

Effect of nitrate/nitrite on *L. innocua*

Figure 4 shows the changes in *L. innocua* counts in the different batches along ripening. In the absence of nitrate/nitrite (batch C) initial *Listeria* counts increased about 1 log cfu/g during the first days of the process. Later, the populations started to decrease reaching a final level of approximately 4.7 log cfu/g. Therefore, when no nitrate/nitrite was added to the batter, *Listeria* counts in the final product were not far from the initial ones. On the contrary, in sausages containing nitrate/nitrite, their inhibitory effect on *Listeria* was clearly observed from the early stages of the process. In these batches, counts gradually decreased, although no differences were observed among them due

to nitrate/nitrite concentration until day 7. At this time, counts were significantly higher ($P<0.05$) in batch LN. The differences among batches became more accentuated along ripening. Thus, final numbers were about 1.5 log cfu/g lower in the batch with the maximum nitrate/nitrite concentration (HN) when compared to batches LN and MN and 2 log cfu/g when compared to control sausages. No significant differences ($P>0.05$) were found between batches LN and MN, but both of them were significantly different from the control batch.

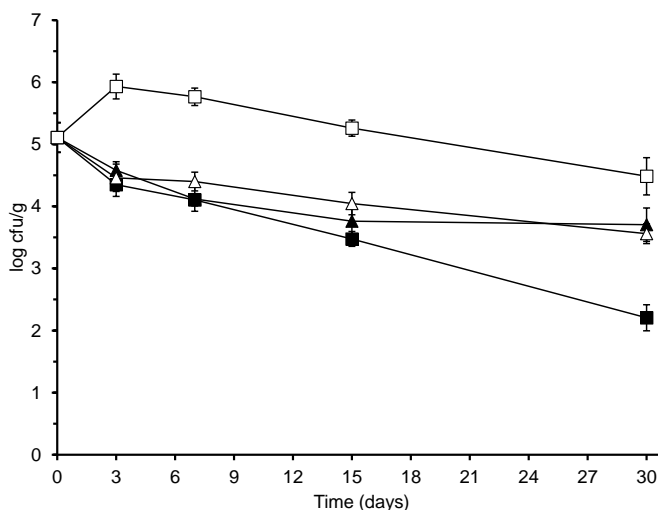


Figure 4. Changes in *Listeria innocua* counts during ripening of dry fermented sausages (■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; batch LN, △ low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite) during the ripening process. Values are the mean of two independent experiments and bars represent the standard error of the mean.

Volatile compounds profile

A total of 56 volatile compounds were identified and quantified when analysing the headspace of the different batches of dry fermented sausages (**Table 1**). Several chemical families of compounds were identified, including aldehydes, hydrocarbons, alcohols, ketones, furans, sulphur compounds, organic acids, esters and terpenes. For the expression of the results, the volatile compounds were classified according to their most likely origin. As some of them can have more than one source, they have been

included in the group corresponding to its principal origin as it has been previously indicated by Ordóñez *et al.* (1999).

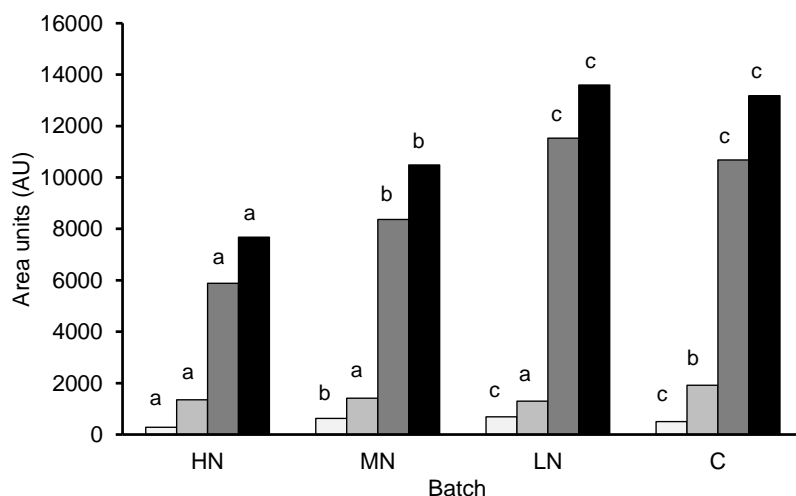


Figure 5. Concentration of volatile compounds grouped according to their origin (□ amino acid degradation, ▒ lipid oxidation, ▓ carbohydrate fermentation and ■ total content). HN: high nitrate/nitrite batch; MN, medium nitrate/nitrite batch; LN, low nitrate/nitrite batch; C, no nitrate/nitrite batch. a, b, c: columns with a different letter for the same group of compounds are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 5 shows the main groups of volatile compounds according to their origin. Carbohydrate-fermentation derived volatiles were the most abundant group and acetic acid was the principal component of this group. The addition of different concentrations of nitrate/nitrite produced significant differences ($P < 0.05$) among batches. Thus, as the concentration of these preservatives was reduced, the level of acetic acid considerably increased (**Table 1**). Likewise, 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) showed a similar behaviour. Lipid oxidation derived compounds represented about 9-17% of the total volatiles. Sausages with no addition of nitrate/nitrite showed a significantly higher ($P < 0.05$) amount of volatiles from lipid oxidation when compared with the other batches (**Table 1**). The volatiles arising from amino acid degradation accounted for 4–5% of the total extracted volatiles. Significant differences ($P < 0.05$) in this group of compounds were found among sausages, batches C and LN showing higher levels than those

prepared with the 25% reduction and the maximum levels of nitrate and nitrite (MN and HN). This group of volatiles includes branched aldehydes (2-methylpropanal, 2-methylbutanal and 3-methylbutanal) and its corresponding alcohols and acids, which have been associated with the characteristic ripened aroma of cured meat products (Ruiz *et al.*, 1999).

DISCUSSION

The physico-chemical parameters (pH, a_w and moisture content) of the experimental sausages were the expected for this type of products. The reported values are similar to those observed by Bruna *et al.* (2001), Mendoza *et al.* (2001) and Ordóñez *et al.* (1999), and accomplished the criteria reflected in the Spanish regulations (Ministerios de Agricultura, de Comercio y Turismo and de Sanidad y Seguridad Social, 1980).

In relation to microbiota, no noticeable effect of nitrate/nitrite on total viable counts and LAB was recorded. Their growth pattern was within the range expected during the ripening of dry fermented sausages (Samelis *et al.*, 1993; Selgas *et al.*, 1988). However, differences among batches were observed for Gram-positive catalase-positive cocci. The typical behaviour of this microbial group in dry fermented sausages is a stabilization or a slight decline along ripening, which is attributed to the decrease in pH and oxygen concentration in the product (Domínguez *et al.*, 1989; Lücke, 1986). This pattern was observed in all batches, and despite both initial and final levels can be considered as typical for dry fermented sausages (Domínguez *et al.*, 1989; Lücke, 1986), higher counts were observed in sausages with the lowest nitrate/nitrite concentration (LN) and the control batch (C). This might be explained by the growth features of staphylococci related to oxygen tension and their particular nitrate- and nitrite-reducing systems. Under anaerobic conditions *S. carnosus* uses nitrate as terminal electron acceptor in nitrate respiration (Götz *et al.*, 2006). In such conditions,

Table 1

Volatile compounds (area units $\times 10^5$) identified in the headspace of dry fermented sausages prepared with different concentrations of nitrate and nitrite.

LRI ¹	Compound	Batch				Method of identification ²
		HN*	MN*	LN*	C*	
	Amino acid degradation	289a	516b	703c	626c	
536	Carbon disulphide	69a	126b	170c	198c	MS + LRI
653	3-Methylbutanal	4a	13b	15b	3a	MS + LRI
736	3-Methyl-1-butanol	5	6	8	8	MS + LRI
817	3-Methylbutanoic acid	7	10	11	9	ms + Lri
825	2-Methylbutanoic acid	4	5	5	4	ms + Lri
980	Phenol	4	7	7	6	MS + LRI
972	Benzaldehyde	43a	32a	62b	67b	MS + LRI
1066	Benzeneacetaldehyde	116a	235b	319c	262b	MS + LRI
1086	4-Methylphenol (<i>p-cresol</i>)	4	5	6	4	ms + Lri
1144	2-Phenylethanol	33a	77b	100c	65b	ms
	Carbohydrate fermentation	5887a	8370b	11527c	10679c	
	2-Propanone	18a	33b	20a	36b	ms
649	Acetic acid	5763a	8207b	11381c	10491c	MS + LRI
666	1-Hydroxy-2-propanone	3	3	2	4	ms + Lri
672	Propanoic acid	26b	13a	23b	36c	MS + LRI
749	3-Hydroxy-2-butanone (<i>acetoin</i>)	19a	39b	37b	33b	MS + LRI
818	Butanoic acid	58a	75b	64a,b	79b	MS + LRI
	Lipid oxidation	1333a	1385a	1280a	1885b	
	<i>Aldehydes</i>	1125a	1172a	1095a	1549b	
	Propanal	69a	131c	45a	86b	ms
708	Pentanal	92b	108b	57a	107b	MS + LRI
754	2-Pentenal	8b	5a	3a	7b	MS + LRI
807	Hexanal	614a	655a	735a,b	942b	MS + LRI
866	2-Hexenal	10a	8a	7a	19b	MS + LRI
907	Heptanal	64a	73a	55a	86b	MS + LRI
930	2,4-Hexadienal	13b	6a	13b	14b	ms
968	2-Heptenal	55a,b	40a	28a	67b	MS + LRI
1007	Octanal	46a,b	36a	37a	60b	MS + LRI
1069	2-Octenal	22a	17a	15a	29a,b	MS + LRI
1107	Nonanal	82b	62a	62a	96b	MS + LRI
1169	2-Nonenal	19	12	15	16	MS + LRI
1207	Decanal	10b	5a	6a,b	4a	MS + LRI
1271	2-Decenal	21	14	17	16	MS + LRI

Table 1 (*continued*)

LRI ¹	Compound	Batch				Method of identification ²
		HN*	MN*	LN*	C*	
	<i>Alcohols</i>	93b	80a	76a	152c	
560	1-Propanol	1a	6b	7b	4b	MS + LRI
665	1-Butanol	4	3	2	2	MS + LRI
766	1-Pentanol	19	16	16	27	MS + LRI
862	1-Hexanol	20a	17a	14a	39b	MS + LRI
966	1-Heptanol	15c	7b	1a	9b	MS + LRI
977	1-Octen-3-ol	28a	26a	32a	59c	MS + LRI
1066	1-Octanol	6a	5a	4a	12b	MS + LRI
	<i>Ketones</i>	70b	65b	57a	113c	
683	2-Pentanone	9a	13b	9a	14b	MS + LRI
690	1-Penten-3-one	6b	6b	3a	5a,b	ms + Iri
898	2-Heptanone	14b	12b	10a,b	23c	MS + LRI
981	1-Octen-3-one	9a,b	6a	7a	13b	ms + Iri
980	2,3-Octanedione	23b	19a	16a	40c	ms + Iri
1090	2-Nonanone	9a	9a	12b	18b	MS + LRI
	<i>Furans</i>	45a	68b	52a	71b	
607	2-Methylfuran	31a	57c	43b	41b	MS + LRI
702	2-Ethylfuran	6a,b	7a,b	5a	11b	MS + LRI
988	2-Pentylfuran	8b	4a	4a	19c	MS + LRI
	<i>Microbial esterification</i>	5a	13b	7a	8a,b	
515	Methylacetate	1a	6b	5b	5b	ms
615	Ethylacetate	4a,b	7b	2a	3a	MS + LRI
	<i>Spices</i>	62a	64a	93b	84b	
880	1,4-Dimethylbenzene (<i>p</i> -xylene)	12	10	13	9	ms + Iri
980	β-Myrcene	14a	19a,b	28b	28b	ms + Iri
1012	α-Pinene	23a	30a,b	41b	45b	ms + Iri
1023	2-Ethylhexanol	13c	5b	11c	2a	ms
	<i>Unknown origin/Miscellaneous</i>	83	72	74	71	
857	Pentanoic acid	9	9	7	12	MS + LRI
950	Butyrolactone	12	11	13	11	ms + Iri
954	Hexanoic acid	44	38	37	30	MS + LRI
1148	Octanoic acid	18	14	17	18	MS + LRI
Total volatiles		7659a	10420b	13684c	13353c	

¹ Linear retention index on a 5MS/silphenylene polysiloxane column.

² MS+LRI, mass spectrum and LRI agree with those of authentic compounds; ms+Iri, mass spectrum and LRI in agreement with the literature; ms, mass spectrum agrees with spectrum in NIST'05 Mass Spectral. a, b, c: values in a row with different letters are significantly different ($P<0.05$).

* Batch HN: high nitrate/nitrite; Batch MN: medium nitrate/nitrite; Batch LN: low nitrate/nitrite; Batch C: control.

this organism rapidly reduces nitrate to nitrite and, once nitrate is depleted, final levels can be considered as typical for dry fermented sausages (Domínguez *et al.*, 1989; Lücke, 1986), higher counts were observed in sausages with the lowest nitrate/nitrite concentration (LN) and the control batch (C). This might be explained by the growth features of staphylococci related to oxygen tension and their particular nitrate- and nitrite-reducing systems. Under anaerobic conditions *S. carnosus* uses nitrate as terminal electron acceptor in nitrate respiration (Götz *et al.*, 2006). In such conditions, this organism rapidly reduces nitrate to nitrite and, once nitrate is depleted, nitrite reduction occurs. Both nitrate and nitrite reductions promote growth under anoxic conditions (Neubauer and Gotz, 1996). However, staphylococci, although facultatively anaerobic, grow much better in the presence of oxygen. Therefore, the growth of staphylococci in the core of dry fermented sausages is limited and higher numbers may be expected close to the surface (Lücke, 1998). Local oxygen tension in the outer layers would cause the inhibition of reductase activity (Neubauer and Gotz, 1996) and this would allow nitrite to exert a certain inhibitory effect on staphylococci through different mechanisms interfering respiratory chain (Rowe *et al.*, 1979), which was more evident in batches manufactured with the highest levels of nitrate/nitrite. Additionally, in the inner part of these sausages, nitrate reduction stimulated by the high concentration of nitrate (Götz *et al.*, 2006) would lead to an internal accumulation of nitrite as a result of the decrease of nitrite reduction/export and, eventually, it would slow down staphylococcal growth.

Initial counts of *Enterobacteriaceae* were within the range reported for dry fermented sausages (López *et al.*, 2004). These numbers are common since these organisms are very ubiquitous and can contaminate meat from the digestive tract during carcass dressing and also from the utensils during manufacture of meat products (Ferreira *et al.*, 2007; Troeger and Wolsterdorf, 1989). *Enterobacteriaceae* are sensitive to low pH and a_w , but also to nitrite (Lizaso *et al.*, 1999; Moretti *et al.*, 2004) and therefore, their levels typically decrease along ripening. During the first days of the process, numbers can remain constant or even slightly increase before the explosive growth of LAB and consequent fall of pH, being low concentrations of nitrite a favouring factor (Lücke, 1986). A clear increase of *Enterobacteriaceae* counts was observed in

batches C and LN, which evidences the importance of an adequate concentration of nitrate/nitrite to control these organisms. This influence was more noticeable at the end of the ripening, when *Enterobacteriaceae* were not detected only in sausages with the maximum levels of nitrate/nitrite (batch HN).

The initial increase in *Listeria* counts observed in batch C is explained by the pH and a_w values which were adequate for the growth of this organism, together with the absence of nitrite in the batter. Later, the combination of $\text{pH} < 5.0$ and $a_w < 0.94$ at day 7 established unfavourable conditions for *Listeria* (Farber and Peterkin, 1991; Nolan *et al.*, 1992), and then the population started to decrease. In sausages containing nitrate/nitrite, the inhibitory effect of these preservatives caused the decline of *Listeria* numbers from the beginning of ripening. At day 7 the combination of pH and a_w was not favourable itself for *Listeria*, but the additional inhibitory effect of nitrate/nitrite was responsible for the lower counts observed in batches MN and HN in comparison with LN sausages. As previously mentioned, the differences due to the concentration of these preservatives in the mixture became more evident in the final product. According to the literature, listeriae typically decline at a low rate during ripening, due to the hostile environment that progressively colonizes the sausage (Lücke, 1998). The results obtained in this study confirm the significant role that nitrate/nitrite plays in the inhibition of *Listeria* on dry fermented sausages, so reducing the addition of these preservatives would lead to higher final numbers in case the batter were contaminated with *Listeria*. The inhibitory effect of nitrate/nitrite on these organisms has also been reported in *in vitro* assays (Shahmat *et al.*, 1980).

In relation to the volatile profile, although accurate quantification is difficult when using SPME-GC-MS, it is possible to use this technique for comparing the relative amounts of the different compounds among samples when the same analysis procedure is used (Roberts *et al.*, 2000). High levels of carbohydrate-fermentation derived volatiles have also been reported in dry fermented sausages (de Campos *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2004) and Iberian dry cured loins (Soto *et al.*, 2010). The higher level of acetic acid and acetoin could be related to the effect of nitrate/nitrite concentrations on Gram-positive catalase-positive cocci which, as explained above, were significantly higher ($P < 0.05$) in batches C and LN than in MN and HN. It has been reported in the literature

that the starter bacteria *S. xylosus* produce, among others, acetic acid and acetoin from carbohydrate fermentation (Stahnke, 1999).

Volatile compounds from lipid oxidation have been considered essential to the proper development of the flavour of cured meat products (Shahidi *et al.*, 1986). Recent studies show that compounds included in this group, mainly aliphatic saturated aldehydes, are important contributors to dry fermented sausage aroma (Marco *et al.*, 2007; Olivares *et al.*, 2009). Values obtained in the present study are within the range reported in Milano salami (Meynier *et al.*, 1999). The higher levels in batch C clearly prove the antioxidant effect exerted by nitrite. On the other hand, a low amount of nitrate/nitrite (50% reduction over the maximum limit) was enough to achieve the same modulating effect on lipid oxidation.

Free amino acids can yield volatile compounds via Strecker degradation (Barbieri *et al.*, 1992) and through microbial metabolism (Degorce-Dumas *et al.*, 1984). The latter pathway has been proposed in dry fermented sausages since some starter cultures, such as *S. xylosus* and *S. carnosus*, are able to form branched aldehydes and their corresponding alcohols and acids from amino acids (Hinrichsen and Andersen, 1994). The ability of LAB isolated from meat to produce volatile compounds from leucine has also been studied (Larrouture *et al.*, 2000). These authors observed that the catabolism of this amino acid by lactic acid bacteria was very low as well as these organisms could only generate volatiles via transamination. In contrast, staphylococci, with a higher catabolism, can use two pathways, oxidative deamination and transamination. Therefore, the significant differences ($P<0.05$) in amino acid degradation volatiles found among batches could be attributed to the different counts of Gram-positive catalase-positive cocci. For this reason, batches C and LN showed higher levels of these compounds.

CONCLUSIONS

Nitrate and nitrite exert an important effect on different microbial groups which have a great impact on the quality and safety of dry fermented sausages. Reducing the amount of these preservatives in the batter below the maximum levels allowed by

European regulations would increase the numbers of Gram-positive catalase-positive cocci and *Enterobacteriaceae*. The former would significantly change the volatile composition of the product, although the pattern obtained could be included within the wide variety of volatile profiles reported for dry fermented sausages. Nitrate and nitrite reduction would lead to higher final counts of *Enterobacteriaceae* in comparison with sausages manufactured with the currently allowed maximum amounts, in which these organisms are often not detected at the end of the ripening. From a safety viewpoint, a lower amount of nitrate and nitrite would lead to higher numbers of *Listeria* in the product in case the batter were contaminated with this organism, which would be of concern in relation to the control of this pathogen in the meat industry. These considerations should be taken into account in view of a future restriction in the use of nitrate and nitrite in meat products.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Programme Consolider-Ingenio 2010, Project CSD 2007-00016). The authors also thank Universidad Complutense de Madrid (group 920276, GR35/10A) for its financial support.

REFERENCES

- AOAC, 2006. Official Methods of Analysis, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M., Mangia, A., 1992. Flavor compounds of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2389–2394.
- Bruna, J.M., Ordóñez, J.A., Fernández, M., Herranz, B., de la Hoz, L., 2001. Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Science* 59, 87–96.
- Dainty, R.H., Shaw, B.G., Boer, K.A.D., Schepps, E.S.J., 1975. Protein changes caused by bacterial-growth on beef. *Journal of Applied Bacteriology* 39, 73–81.
- De Campos, R.M.L., Hierro, E., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L., 2007. Fatty acid and volatile compound composition of Italian and Brazilian Milano salami. *Sciences des Aliments* 27, 234–244.

- Degorce-Dumas, J.R., More, J., Goursaud, J., Leveau, J.Y., 1984. Aroma production by microorganisms. The potentialities. *Industries Agricoles et Alimentaires* 101, 11–15.
- Domínguez, M.C., Gutiérrez, L.M., López, A., Seco, F., Zumalacárregui, J.M., 1989. Development of the principal groups of microorganisms during the ripening of chorizo sausage from León. *Alimentaria* 26, 11–15.
- EFSA, 2003. The effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *EFSA Journal* 14, 1–31.
- European Commission, 2005. Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L338, 1–26.
- European Commission, 2010. Commission Decision of 25 May 2010 concerning national provisions notified by Denmark on the addition of nitrite to certain meat products (2010/561/EU). *Official Journal of the European Union* L247, 55–65.
- European Parliament, 2006. European Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L204, 10–22.
- FAO/WHO, 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. *FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series* 4, 1–48.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55, 476–511.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Johnston, M.A., 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *Journal of Food Protection* 52, 456–458.
- Fenlon, D.R., Wilson, J., Donachie, W., 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 641–650.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., Monteiro, M.J., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P., 2007. Chemical and microbiological characterisation of "Salpicão de Vinhais" and "Chouriça de Vinhais": traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food Microbiology* 24, 618–623.
- Flores, J., Bermell, S., 1996. Dry-cured sausages—factors influencing souring and their consequences. *Fleischwirtschaft* 76, 163–165.
- Flores, M., Dura, M.A., Marco, A., Toldrá, F., 2004. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science* 68, 439–446.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.H., 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Dworkin, M. (Ed.), *The Prokaryotes*. Springer Science, New York, pp. 5–75.
- Hecht, S.S., 1997. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 216, 181–191.
- Hinrichsen, L.L., Andersen, H.J., 1994. Volatile compounds and chemical-changes in cured pork—role of 3 halotolerant bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1537–1542.
- Institute of Food Technologists, 2003. Microbiological Challenge Testing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2 (Supplement), 46–50.
- Kamat, A.S., Nair, P.M., 1996. Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *L. monocytogenes* by some meat processing treatments. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 29, 714–720.

- Kondjoyan, N., Berdagué, J.L.A., 1996. Compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds. Laboratoire Flaveur (INRA), Theix.
- Larrouture, C., Ardaillon, V., Pepin, M., Montel, M.C., 2000. Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology* 17, 563–570.
- Lizaso, G., Chasco, J., Beriain, M.J., 1999. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiology* 16, 219–228.
- López, C., Medina, L.M., Jordano, R., 2004. Occurrence and behavior of *Enterobacteriaceae* and enterococci in Mediterranean dry sausages during ripening in a pilotscale chamber. *Journal of Food Protection* 67, 2812–2814.
- Lücke, F.K., 1986. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtschaft* 66, 1505–1509.
- Lücke, F.K., 1998. Fermented sausages. In: Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional, London, pp. 441–483.
- Marco, A., Navarro, J.L., Flores, M., 2007. Quantification of selected odor-active constituents in dry fermented sausages prepared with different curing salts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3058–3065.
- Mendoza, E., García, M.L., Casas, C., Selgas, M.D., 2001. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science* 57, 387–393.
- Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., Gandemer, G., 1999. Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science* 51, 175–183.
- Ministerios de Agricultura, de Comercio y Turismo, and de Sanidad y Seguridad Social, 1980. Orden de 7 de febrero de 1980 por la que se aprueba la norma de calidad para productos cárnicos embutidos crudo-curados en el mercado interior. *Boletín Oficial del Estado* 70, 6283–6284.
- Moretti, V.M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M.A., Panseri, S., Pirone, G., Gandini, G., 2004. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science* 66, 845–854.
- Neubauer, H., Götz, F., 1996. Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology* 178, 2005–2009.
- Noel, P., Briand, E., Dumont, J.P., 1990. Role of nitrite in flavor development in uncooked cured meat-products—sensory assessment. *Meat Science* 28, 1–8.
- Nolan, D.A., Chamblin, D.C., Troller, J.A., 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* 16, 323–335.
- Olesen, P.T., Meyer, A.S., Stahnke, L.H., 2004. Generation of flavour compounds in fermented sausages—the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science* 66, 675–687.
- Olivares, A., Navarro, J.L., Flores, M., 2009. Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage. *Food Chemistry* 115, 1464–1472.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., de la Hoz, L., 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39, 329–367.
- Pegg, R.B., Shahidi, F., 2000. Nitrite Curing of Meat, The N-nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives. Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, CT, USA.
- Reddy, D., Lancaster, J.R., Cornforth, D.P., 1983. Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*-electron-spin resonance detec-

- tion of iron nitric-oxide complexes. *Science* 221, 769–770.
- Roberts, D.D., Pollien, P., Milo, C., 2000. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2430–2437.
- Rowe, J.J., Yarbrough, J.M., Rake, J.B., Eagon, R.G., 1979. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology* 2, 51–54.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., García, C., 1999. Volatile compounds of dry cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science* 52, 19–27.
- Rychlik, M., Schieberle, P., Grosch, W., 1998. Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants. *Lebensmittelchemie und Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Deutsche Forschungsanstalt für Garching, Germany*.
- Samelis, J., Aggelis, G., Metaxopoulos, J., 1993. Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. *Meat Science* 35, 371–385.
- Sawamura, M., Wu, Y.X., Fujiwara, C., Urushibata, M., 2005. Inhibitory effect of yuzu essential oil on the formation of N-nitrosodimethylamine in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4281–4287.
- Sebranek, J.G., Bacus, J.N., 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* 77, 136–147.
- Selgas, M.D., Sanz, B., Ordóñez, J.A., 1988. Selected characteristics of Micrococci isolated from Spanish dry fermented sausages. *Food Microbiology* 5, 185–194.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., Dsouza, L.A., 1986. Meat flavor volatiles—a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 24, 141–243.
- Shahmat, M., Seaman, A., Woodbine, M., 1980. Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *L. monocytogenes*. In: Gould, G.W., Corry, J.E.J. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*. Academic Press, New York, pp. 227–237.
- Soto, E., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Hierro, E., Herranz, B., López-Bote, C., Cambero, M.I., 2010. Volatile profile and sensory characteristics of dry-cured loins as affected by feeding level in the period previous to the late fattening phase and by rearing system of Iberian pigs. *Journal of Muscle Foods* 21, 636–657.
- Stahnke, L.H., 1995. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels—Part II. Volatile components. *Meat Science* 41, 193–209.
- Stahnke, L.H., 1999. Volatiles produced by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces—Part I. Collection and identification. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 32, 357–364.
- Troeger, K., Wolsterdorf, W., 1989. Contaminación microbiana de canales de porcino por el agua de escaldado a través del sistema vascular. *Fleischwirtschaft Español* 1, 13–18.
- Vázquez-Villanueva, J., Orgaz, B., Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J.V., SanJosé, C., 2010. Predominance and persistence of a single clone of *Listeria ivanovii* in a manchego cheese factory over 6 months. *Zoonoses and Public Health* 57, 402–410.

Artículo 2
Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry
fermented sausages on the survival of *Salmonella*
Typhimurium
Food Research International 2014, 62, 410-415



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella* Typhimurium

Xavier F. Hospital, Eva Hierro *, Manuela Fernández

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Received 8 January 2014, Received in revised form 7 March 2014, Accepted 29 March 2014

Abstract

Salmonella is one of the pathogens that most frequently contaminate pork processing lines. Several hurdles can control this organism in dry fermented sausages, among them is nitrite. However, the traditional use of nitrate/nitrite in the meat industry is being questioned due to their involvement in nitrosamine formation. In this study, minced pork and sausages inoculated with *Salmonella* Typhimurium were prepared with 150 ppm NaNO_3 and 150 ppm NaNO_2 (maximum amounts allowed by EU), and with a reduction of 25% and 50%. The absence of nitrate/nitrite favored *Salmonella* growth, with 2–2.5 log cfu/g higher counts at the end of ripening, compared to nitrate/nitrite added batches. The 50% reduction showed the same inhibitory effect as the maximum amounts. Nitrate/nitrite represented an essential hurdle to control *Salmonella* even when pH and a_w were below the values considered as minimum for its growth. The effect of this reduction on other pathogens should be considered.

Keywords: Nitrate, Nitrite, Dry fermented sausages, *Salmonella* Typhimurium

INTRODUCTION

In the manufacture of dry fermented sausages, the addition of curing agents (salt and nitrate/nitrite), as well as the low pH and water activity (a_w) achieved during ripening, act as hurdles for food-poisoning and spoilage bacteria, ensuring the stability and safety of the final product (Vignolo, Fontana, & Fadda, 2010). However, these products may still cause food-borne outbreaks as a result of unsuccessful sausage fermentation in which pH and a_w limiting conditions are not properly established, or due to high initial contamination levels of the raw material.

Salmonella is an important cause of food-borne disease in humans, with more than 99,000 cases of salmonellosis reported in 2010 in the EU (EFSA, 2012). It is believed that about 10–20% of human salmonellosis would be caused by consumption of pork (EFSA, 2010), which is often the main ingredient of dry fermented sausages. *Salmonella* Typhimurium is the most frequently serovar isolated from pigs (EFSA, 2010), being a common cause of infection in humans (EFSA, 2008). In this sense, several salmonellosis outbreaks have been reported due to the consumption of fermented sausages (Bremmer *et al.*, 2004; Cowden *et al.*, 1989; Emberland *et al.*, 2006; Gilsdorf *et al.*, 2005; Luzzi *et al.*, 2007; Nygard *et al.*, 2007; Pontello, Dodano, Nastasi, & Mammìna, 1998; Ulutan, Sultan, Davutoglu, & Usta, 1988). In the USA, Levine, Rose, Green, Ransom, and Hill (2001) reported 1.4% prevalence of *Salmonella* spp. in fermented sausages collected in Federally-inspected plants between 1990 and 1999. The USA and EU regulations establish a food safety criterion of absence of *Salmonella* in 25 g throughout the shelf-life of dry fermented sausages (European Commission, 2005; USDA/FSIS, 2010).

Nitrate and nitrite are added to meat products due to their important role on color and flavor development and their antioxidant activity (Honikel, 2008). Furthermore, nitrite exerts a significant antimicrobial effect related to the inhibition of the growth of several pathogens, such as *Listeria* spp. and *Clostridium botulinum* (Hospital, Hierro, & Fernández, 2012; Sebranek & Bacus, 2007), whereas its effect on the inhibition of *Salmonella* spp. is controversial (Tompkin, 2005). Despite these relevant technological

and safety functions, there is great concern regarding the role of nitrite in the formation of N-nitrosamines (Hecht, 1997; Pegg & Shahidi, 2000).

In the EU, nitrate and nitrite are currently restricted by Regulation nº 1129/2011 (European Commission, 2011) in which risks and benefits are balanced taking into account the great variety of meat products manufactured and traded among the member states. But in a near future, the current levels of nitrate/nitrite allowed by the European regulations could be revised due to a request by Denmark, which considers that its national and more restrictive regulation provides enough protection against food poisoning. This situation, together with the increasing demand of additive-free products by consumers and the more detailed knowledge about the chemistry of nitrite in foods have renewed the interest in this preservative. It becomes necessary to assess if the reduction of the maximum authorized concentration of nitrate/nitrite added to dry fermented sausages could affect both, the typical microbiota and the survival of pathogens, compromising their quality and safety. The purpose of this work was to study the effect of reduced levels of nitrate and nitrite on the survival of *Salmonella* Typhimurium in dry fermented sausages.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Two strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (CECT 443 and CECT 722) were used for direct inoculation in challenge experiments. *Lactobacillus plantarum* CECT 220, *Staphylococcus xylosus* CECT 237 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 were used as starter cultures. All the strains were obtained from the Spanish Collection of Type Cultures (CECT, Valencia, Spain).

Stock cultures of each organism were maintained at -20 °C in the appropriate cultivation broth containing 20% (v/v) glycerol. The two *Salmonella* strains and the two *Staphylococcus* sp. were cultivated in Tryptone Soy Broth (TSB) and Tryptone Soy Agar (TSA) (Pronadisa, Madrid, Spain). Man-Rogosa–Sharpe (MRS) broth and agar (Pronadisa), adjusted to pH 5.7 was used for the growth of *L. plantarum*.

Inoculum preparation

From the frozen culture, each strain was grown successively twice at 37 °C for 24 h in 10 ml of the corresponding cultivation broth. Subsequently, *Salmonella* and the two staphylococci were plated on TSA, and lactobacilli on MRS agar, and incubated under the same conditions. For each organism, one colony was transferred into 10 ml of broth and incubated at 37 °C to reach the stationary growth phase. To prepare the strain mixture of *Salmonella*, 500 µl of each stationary growth phase strain culture was added to 9 ml of saline solution (0.85% NaCl) to achieve a cell concentration of ca. 8 log cfu/ml.

Preparation of minced meat and sausages

Mediterranean-style dry fermented sausages (Spanish *salchichón*) were manufactured at the pilot plant of the Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Universidad Complutense de Madrid, Spain). Prior to sausage manufacture, preliminary assays were carried out in minced meat under aerobiosis and anaerobiosis, which was used as a model system to assess the combined effect of nitrate and nitrite concentrations and oxygen tension on *Salmonella* at ripening temperatures.

For either minced meat samples or sausages, a mixture of lean pork (60%) and pork back fat (40%) was used. The mixture was minced using a 6 mm plate Garhe MR-9 mincer (Garhe, Amorebieta, Spain) and then inoculated with the *Salmonella* cocktail to obtain a final concentration of 3-5 log cfu/g.

For the experiments with minced meat, 2.4% NaCl was added to the inoculated batter, mixed for 2 min and divided into 4 batches: 1) added with 150 ppm NaNO₃ and 150 ppm NaNO₂ (high nitrate/nitrite batch, HN), at present the maximum amount allowed by the EU in *salchichón* to be ripened for less than 30 days; 2) added with 112.5 ppm NaNO₃ and 112.5 ppm NaNO₂ (25% reduction: medium nitrate/nitrite batch, MN); 3) added with 75 ppm NaNO₃ and 75 ppm NaNO₂ (50% reduction: low nitrate/nitrite batch, LN); and 4) a control batch with no nitrate/nitrite added (C). After a second mixing step, 30 g portions of the mixtures were placed into 60 mm diameter petri dishes. Half of the samples were aerobically stored at 10 °C, whereas the other half were vacuum-

packaged in low permeability laminated bags (35 and 150 cm³/24 h·m²·bar to O₂ and CO₂, respectively) and stored at the same temperature. Samples were periodically taken and the experiments finished when meat showed evidence of spoilage.

Salchichón-type sausages were manufactured by adding lactose (3%), NaCl (2.4%), dextrose (0.5%), ground black pepper (0.25%) and the starter cultures to the *Salmonella*-inoculated batter. Starter cultures were formulated to reach an approximate concentration in the batter of ca. 5–6 log cfu/g (in a proportion 1:1:1). The batter was then divided into 4 batches added with the same nitrate/nitrite concentration as described above. The mixtures were stuffed into 45 mm diameter collagen casings, resulting in sausages of approximately 150 g, which were sprayed with 20% potassium sorbate to avoid the growth of superficial molds. The sausages were fermented and dried for 25 days under the following conditions: 2 days at 22 °C and 90% relative humidity (RH), 24 h at 19 °C and 88% RH, 24 h at 15 °C and 86% RH, and 21 days at 12 °C and 85% RH. At the end of ripening, one sausage of each batch was vacuum-packaged and stored at 4 °C for 30 days. Microbial and physico-chemical analyses were performed at days 0, 3, 12, and 25 of ripening and after 30 days of storage.

Microbial analysis

Samples of 15 g were homogenized with 25ml of saline solution for 2 min in a Stomacher 400 (Colworth, London, UK). Ten-fold dilution series were prepared from this homogenate.

Total viable counts (TVC) were enumerated on Plate Count Agar (PCA) (Pronadisa) with 1% NaCl according to the recommendations by Dainty, Shaw, Boer, and Scheps (1975), and incubated at 32 °C for 48 h. Gram-positive catalase-positive cocci (GCC+) were determined on Mannitol-Salt Agar (MSA) (Pronadisa) at 32 °C for 48 h. Lactic acid bacteria (LAB) were plated on double layer MRS agar at pH 5.7 and incubated at 32 °C for 48 h. Psychrotrophic bacteria were determined on PCA with 1% NaCl at 7 °C for 10 days. *Brochothrix thermosphacta* was enumerated in vacuum-packaged samples using Streptomycin sulfate/Thallium acetate/Actidione Agar (STAA) with STA selective supplement (Oxoid, Unipath, Basingstoke, UK) and incubated at 22 °C for 48 h. Finally, *Salmonella* was determined on Salmonella–Shigella agar (SS)

(Oxoid) after incubation at 37 °C for 24 h. The results were expressed in log cfu/g. The limit of detection for Salmonella was 0.4 log cfu/g.

Physico-chemical analysis

Measurement of pH was carried out using a Crison PH 25+ pH meter with a penetration electrode 5053 T I-045 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) by introducing the electrode in the center of the sausage. Water activity was measured in 3 mm thick sausage slices using a dew point hygrometer Decagon CX-1 (Decagon Devices, Pullman, WA) at 25 °C.

Statistical analysis

For either minced meat or sausages, two independent manufacturing processes were carried out with the same formulation and technology. In each manufacture, three sample units (minced meat or sausages) were taken per sampling day ($n = 6$). All analyses were performed by duplicate. The results reported in this study are the mean obtained from all the data recorded for each parameter analyzed.

Statistical analysis was carried out using Statgraphics Centurion XVI.I (Statpoint Technologies, Warrenton, VA). A one-way ANOVA was conducted to rule out the effect of the concentration of nitrate/nitrite on each single parameter (a_w , pH and microbial counts) analyzed on each sampling day. Statistical significance was identified at 95% confidence level. Duncan's multiple range test was used for mean comparisons.

RESULTS

pH and a_w

The pH and a_w values of minced meat ranged from 5.7 to 6.3 and 0.96–0.98, respectively, depending on the sample and storage time (data not shown). **Figure 1** shows the changes in these parameters in dry fermented sausages. After a quick drop during fermentation, the final pH of sausages was approximately 5.2, which allowed a correct texture development in the product. In relation to a_w , initial values (0.97) steadily fell to approximately 0.83–0.85 in the final product. No significant differences ($P > 0.05$)

were found among batches for all these parameters and no changes were observed after 30 days of storage.

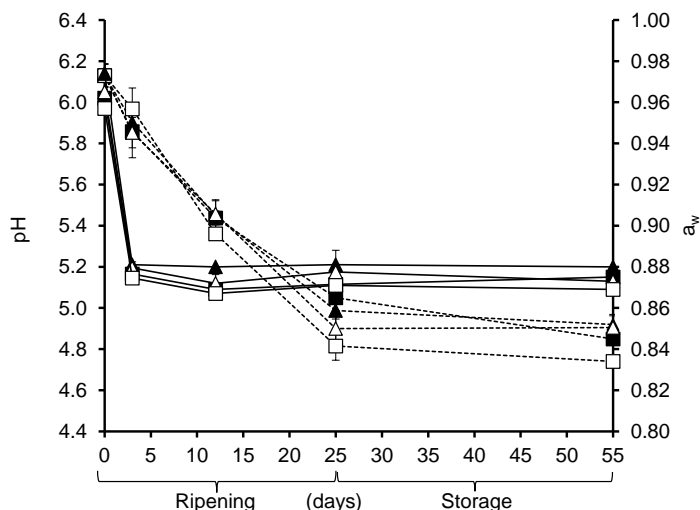


Figure 1. pH (—) and a_w (---) of dry fermented sausages prepared with different concentrations of nitrate/nitrite during ripening and storage time. ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation.

Study on minced meat

The reduction of nitrate/nitrite content increased TVC in aerobically packaged samples. These differences were observed after 4 days of storage, when batches MN and HN exhibited approximately 1.5 log cfu/g lower counts ($P<0.05$) in comparison to control samples (**Table 1**). Batch LN showed around 0.5 log cfu/g difference. The behavior of psychrotrophic bacteria was similar to that of TVC (data not shown).

In vacuum-packaged samples, lower differences were observed for TVC, although batch C still showed higher numbers (data not shown). The counts of *B. thermosphacta* showed significant differences ($P<0.05$) between batch C and nitrate/nitrite samples, increasing by 0.5–1 log cfu/g when no nitrate/nitrite were added (**Table 1**). No significant differences due to the concentration of curing agents were observed in LAB counts (data not shown).

Table 1

Changes in Total Viable Counts (TVC) and *Brochothrix thermosphacta* (log cfu/g) during storage of packaged minced meat at 10 °C.

Microbial group	Packaging	Storage day	Batch			
			HN*	MN*	LN*	C*
TVC	Aerobiosis	0	5.69 ± 0.01	5.69 ± 0.01	5.69 ± 0.01	5.69 ± 0.01
		3	6.94 ± 0.24a	7.09 ± 0.04a	7.02 ± 0.01a	7.33 ± 0.03b
		4	7.14 ± 0.29a	7.36 ± 0.04a	7.87 ± 0.10b	8.40 ± 0.01c
		5	7.28 ± 0.25a	7.42 ± 0.05a	7.79 ± 0.03b	8.42 ± 0.23c
<i>B.thermosphacta</i>	Vacuum	0	4.99 ± 0.00	4.99 ± 0.00	4.99 ± 0.00	4.99 ± 0.00
		5	5.25 ± 0.02a	5.37 ± 0.14a	5.62 ± 0.04b	6.02 ± 0.07c
		8	5.10 ± 0.13a	5.33 ± 0.09a,b	5.43 ± 0.13b	5.96 ± 0.20c
		12	5.30 ± 0.07	5.20 ± 0.24	5.40 ± 0.20	-

a, b, c: values in a row with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

* Batch HN: high nitrate/nitrite; Batch MN: medium nitrate/nitrite; Batch LN: low nitrate/nitrite; Batch C: control with no nitrate/nitrite.

Salmonella final counts were approximately 0.5 log cfu/g higher ($P < 0.05$) in the absence of nitrate/nitrite, either when minced meat was aerobically or anaerobically stored (**Figure 2**). Also, in vacuum-packaged control samples, an increase of 1 log cfu/g was observed at day 5.

Microbiology of dry fermented sausages

In relation to the typical microbiota (**Figure 3**), LAB counts followed the usual pattern of dry fermented sausages, with a rapid increase to 8–9 log cfu/g during fermentation, followed by stabilization along ripening and storage. No differences ($P > 0.05$) were observed among batches. Although, GCC+ showed in all batches the typical behavior reported for these products, a significant effect of nitrate/nitrite concentration ($P < 0.05$) was observed, with counts ranging from 4 to 6.5 log cfu/g at the end of ripening. Thus, batch C showed approximately 1 log cfu/g higher numbers of this microbial group than LN sausages, and around 2 log cfu/g than MN and HN. The differences were slightly reduced after 30 days of cold storage.

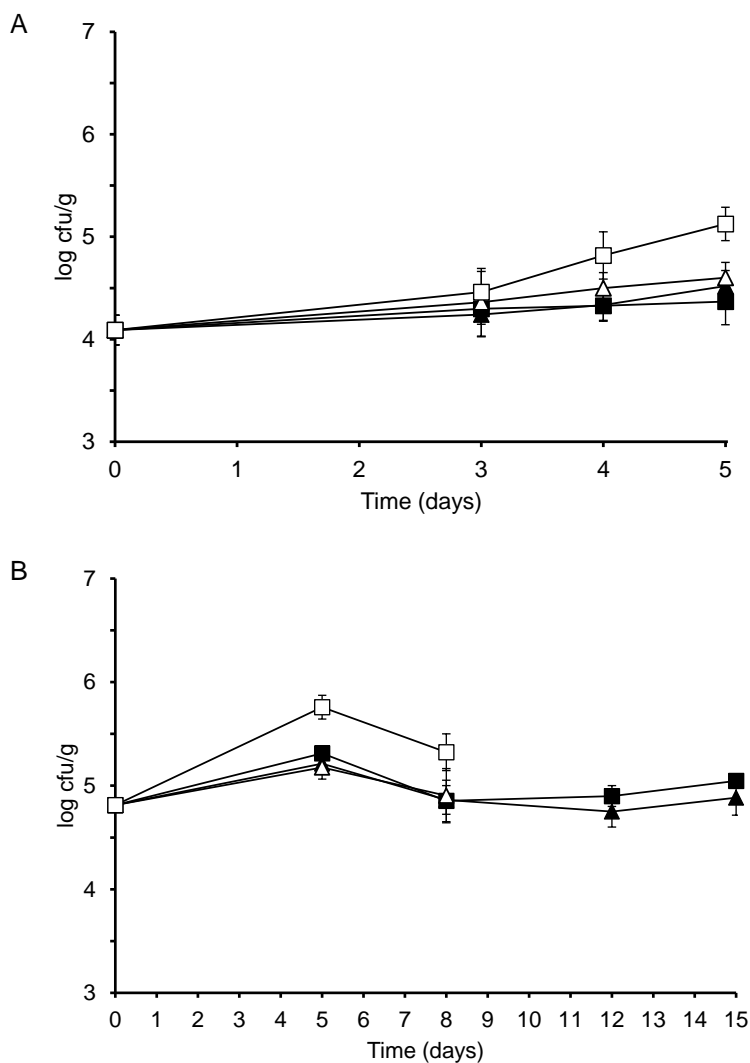


Figure 2. Changes in *Salmonella* Typhimurium during storage of minced meat at 10 °C and under aerobic packaging (A) and vacuum packaging (B). ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Batch C stored under anaerobiosis showed spoilage after day 8. Error bars correspond to the mean standard deviation.

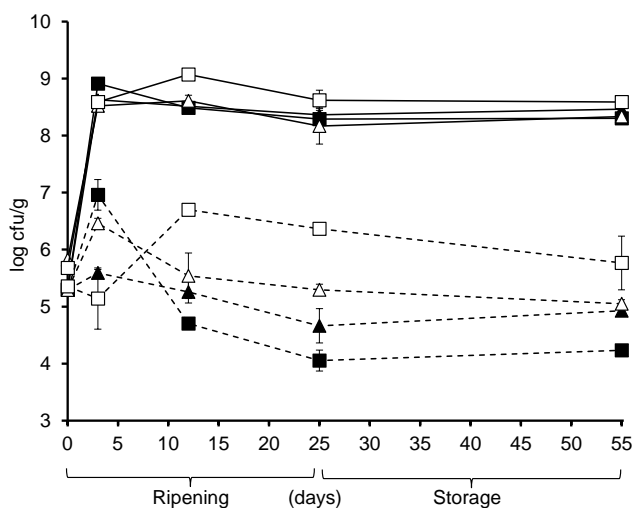


Figure 3. Changes on the typical microbiota of dry fermented sausages manufactured with different concentrations of nitrate and nitrite during ripening and storage time. Lactic acid bacteria (—); Gram-positive catalase-positive cocci (---); ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation.

Figure 4 shows the changes in *S. Typhimurium* counts in the different batches along ripening and storage. While no significant differences ($P>0.05$) were observed among sausages containing nitrate/nitrite, these batches differed from the control one. The inhibitory effect of nitrite was exerted during the first days of ripening. *S. Typhimurium* rapidly grew during the fermentation stage from initial levels of 3 log cfu/g to approximately 5.5 log cfu/g in batch C, while in the presence of nitrate/nitrite, numbers increased only by 1 log cfu/g. A slight increase was also observed in control sausages at day 12. Afterwards, *Salmonella* counts followed a decreasing trend along ripening in all batches, with similar death rates for all curves. Only the sausages added with nitrate/nitrite showed final levels lower than the initial ones, due to the lower levels of *Salmonella* reached during fermentation. At the end of the ripening, counts were approximately 2–2.5 log cfu/g higher in batch C than in nitrate/nitrite added sausages.

At the end of storage, *Salmonella* was only detected in the control samples at a concentration of approximately 2 log cfu/g.

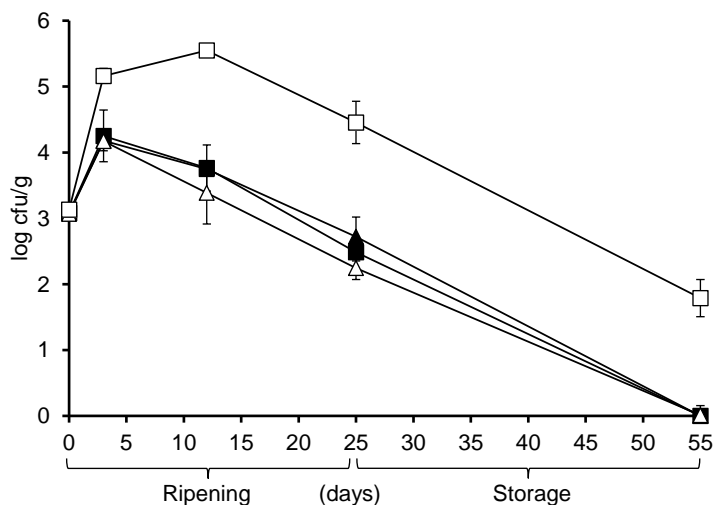


Figure 4. Changes in *Salmonella* Typhimurium during ripening and storage of dry fermented sausages. ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation.

DISCUSSION

Study on minced meat

TVC and LAB numbers observed in our study are in accordance to those reported by Koutsoumanis, Stamatiou, Drosinos, and Nychas (2008) in minced pork aerobically packaged and stored at 10 and 15 °C. The increase of TVC was related to the growth of psychrotrophic microorganisms. In those conditions, *Pseudomonas* spp. have a clear advantage in comparison to other genera (Gill & Newton, 1977). However, the higher psychrotrophic bacteria numbers in the absence of nitrate/nitrite and, to a lesser extent, when the amount of these additives was reduced by 50%, could be explained by the effect that these compounds have on these microorganisms. Rowe, Yarbrough, Rake,

and Eagon (1979) reported that in the presence of oxygen, nitrite inhibits active transport, oxygen uptake and oxidative phosphorylation in *Pseudomonas aeruginosa*; this would take place at cell membrane level by oxidation of ferrous to ferric iron in electron carriers, such as cytochrome oxidase. Other studies suggest that nitrite can also exert an inhibitory effect on specific enzymes, such as aldolases (Yarbrough, Rake, & Eagon, 1980). Thus, as a consequence of the inhibition caused by nitrite on psychrotrophs, TVC were lower when nitrate/nitrite was added to minced meat, especially when the highest concentrations were used.

In relation to LAB counts, our results are in accordance with previous studies that have shown that these bacteria are quite insensitive to nitrite. Korkeala, Alanko, and Tiusanen (1992) observed in *in vitro* studies in MRS broth added with different nitrite concentrations, that LAB seemed to grow well at levels up to 100 mg/l, while a clear reduction was found at 400 mg/l. Furthermore, heterofermentative LAB are more sensitive than homofermentative ones (Dodds & Collins-Thompson, 1984; Korkeala *et al.*, 1992). LAB lack the iron-sulfur enzyme ferredoxin, which is inhibited by nitrite, and is involved in ATP synthesis from pyruvate in other microorganisms such as *C. botulinum* (Jay, 2000).

B. thermosphacta can be selected, together with LAB, as the dominant microbiota of refrigerated pork stored under low oxygen tension. Nielsen (1983) reported that the addition of 100 ppm nitrite to meat appears not to affect this microorganism, but an inhibitory effect was noticed at 200 ppm. In our study, inhibition was also observed with all the nitrate/nitrite concentrations assayed. Collins-Thompson and Rodríguez López (1980) reported that nitrite extended the lag phase of *B. thermosphacta* in culture media incubated at 5 and 15 °C, and they attributed this effect to the lack of a nitrite reductase system.

The effect of nitrate and nitrite on *Salmonella* is a controversial issue. Tompkin (2005), in a review on the survival of *Salmonella* in different products, concluded that nitrite has little effect for controlling Gram-negative enteric pathogens in commercially prepared foods. Likewise, Jay (2000) reported that nitrate and nitrite are generally ineffective against *Enterobacteriaceae*, including salmonellae, and that the effects noted in cured and in vacuum-packaged meats are probably caused by the interaction

of nitrite with other environmental parameters rather than to nitrite alone. On the contrary, Gill and Holley (2003) observed an inhibitory effect of nitrite alone or combined with salt (180 ppm and 2.7%, respectively) on *S. Typhimurium* grown in nutrient broth at 24 °C. In the minced meat samples analyzed in the present study, a slight inhibition by nitrite was observed at 10 °C.

As for all microorganisms, pH, temperature and a_w are closely interrelated for *Salmonella* growth. At optimal pH range between 6.6 and 8.2, growth inhibition has been reported for a_w values below 0.94 in media with neutral pH (Jay, 2000), and the growth rates of *Salmonella* are greatly reduced at temperatures below 15 °C, being 6.2 °C the minimum temperature reported for the growth of *S. Typhimurium* (Bell & Kyriakides, 2002). The environmental conditions of minced meat samples inoculated in this study, although not the best, were favorable for a certain growth of *Salmonella* since, in the absence of nitrate/nitrite, counts slightly increased during storage. However, the presence of nitrate/nitrite, even at the lowest concentration used in this study, collaborated to maintain stable *Salmonella* counts.

Microbiology of dry fermented sausages

Similar to the observations in minced meat, nitrate and nitrite did not affect the growth of LAB in dry fermented sausages, and their behavior during the ripening was as expected for this kind of products (Samelis, Aggelis, & Metaxopoulos, 1993; Selgas, Sanz, & Ordóñez, 1988). Initial and final GCC+ counts can also be considered as typical in dry fermented sausages (Domínguez, Gutiérrez, López, Seco, & Zumalacárregui, 1989; Lücke, 1986) despite the differences observed among batches. The lower levels of GCC+ in batches HN and MN have been previously observed in dry fermented sausages (Hospital *et al.*, 2012) and may be explained by the growth features of staphylococci as a function of their nitrate- and nitrite-reducing systems and the oxygen tension. Although nitrate and nitrite may promote the growth of staphylococci under anoxic conditions, i.e. in the core of sausages (Neubauer & Götz, 1996), the main growth takes place close to the surface and, under aerobic conditions, reductase activity is diminished and nitrite causes the inhibition of staphylococci through interference with the respiratory chain (Rowe *et al.*, 1979).

The initial pH (6.0) and a_w (0.97) of the stuffed batter promoted the growth of *Salmonella* during fermentation in all batches, but even the addition of the lowest amount of nitrate/nitrite (75 ppm + 75 ppm) was enough to reduce the growth rate compared to control sausages. Afterwards, the low pH (below 5.3), as a consequence of carbohydrate fermentation, should be sufficient to inhibit the growth of *Salmonella* (Schillinger & Lücke, 1988), to which also contributes the gradual a_w decrease. However, in the absence of nitrate/nitrite, *Salmonella* still showed a slight growth until day 12 of ripening, despite a pH of 5.2 and a_w below 0.94 (**Figure 1**), which indicates the inhibitory effect of nitrite on *S. Typhimurium*. Minimum pH of 5.4 and 5.5 has been reported for the growth of *Salmonella* in *in vitro* experiments, using acetic and propionic acids, respectively (Chung & Geopfert, 1970). As pH decreases towards minimum values, higher a_w is required for growth (Jay, 2000). Therefore, in our study, the presence of nitrate/nitrite represented an essential hurdle to control *Salmonella* when pH and a_w were even below the values considered as minimum for growth. Furthermore, nitrite, which antibacterial activity is related to the undissociated nitrous acid, is more effective at low pH (Castellani & Niven, 1955; Freese, Sheu, & Galliers, 1973). Nitrite has a pK of 3.29, consequently existing as undissociated nitrous acid at low pH values. The maximum undissociated state and the greatest antibacterial activity of nitrous acid are between pH 4.5 and 5.5 (Jay, 2000).

The viability of *Salmonella* during fermentation and drying has been studied in a variety of fermented meats and conditions. Some authors observed a reduction of *Salmonella* since the beginning of the process in American-style sausages (Ihnot, Roering, Wierzba, Faith, & Luchansky, 1998; Smith, Huhtanen, Kissinger, & Palumbo, 1975) and in Turkish soudjouk (Porto-Fett *et al.*, 2008; Turantas & Unluturk, 1993). In these studies, higher fermentation temperatures than those used in the present work were employed, and significant reduction was obtained as a consequence of pH decrease to 4.5–4.8. However, fermentation temperatures below 22 °C during 48 h and pH above 5.0–5.3, which are common in Mediterranean-style sausages, can promote *Salmonella* growth, as it was observed in our study. Different outbreaks of salmonellosis linked to the consumption of dry fermented sausages have been related to the growth of *Salmonella* during fermentation to levels which resulted in a final product containing

the infective dose. This could be caused by low acidification, reduced ripening time and/or low input of nitrite (Leistner, Hechelmann, & Lücke, 1982; Lücke, 2000; Pontello *et al.*, 1998).

During sausage drying, *Enterobacteriaceae* (including salmonellae) are slowly inactivated by acidity, decreasing a_w and nitrite, with reductions ranging from 1 to 4 log cfu/g (Lücke, 2000). However, if growth has occurred during fermentation and the nitrite hurdle disappears, the reduction of *Salmonella* along ripening and even storage may not be sufficient to guarantee a safe product. In the present study, *Salmonella* decreased approximately 2 log cfu/g after fermentation in batches prepared with nitrite and the pathogen was not detected after storage, while inactivation in the absence of nitrite was approximately 0.5 log cfu/g after fermentation and significant levels were detected after 30 days of storage.

CONCLUSIONS

Nitrite is a relevant hurdle for controlling *Salmonella* in dry fermented sausages in which pH after fermentation is above 5.2. In the experimental conditions tested in this study, the absence of nitrate/nitrite in the formula would promote its growth. However, 50% reduction of the concentration of these preservatives would provide equal protection against *Salmonella* than the maximum ingoing amounts currently allowed by the EU. Nevertheless, to reduce the amount of nitrate/nitrite added to the product, its effect on other pathogens, such as *C. botulinum* or *Listeria monocytogenes*, should be considered.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Programme Consolider-Ingenio 2010, Project CSD 2007- 00016). The authors also thank Universidad Complutense de Madrid (Group 920276, GR35/10A) for its financial support, and for the predoctoral grant conceded to X.F. Hospital.

REFERENCES

- Bell, C., & Kyriakides, A. (2002). *Salmonella*: A practical approach to the organism and its control in foods. Oxford: Blackwell Publishing.
- Bremmer, V., Leitmeyer, K., Jensen, E., Metsel, U., Meczulat, H., Weise, E., et al. (2004). Outbreak of *Salmonella* Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001. *Epidemiology and Infection*, 132, 221–287.
- Castellani, A. G., & Niven, C. F. (1955). Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. *Applied Microbiology*, 3, 154–159.
- Chung, K. C., & Geopfert, J. M. (1970). Growth of *Salmonella* at low pH. *Journal of Food Science*, 35, 326–328.
- Collins-Thompson, D. L., & Rodríguez López, G. (1980). Influence of sodium nitrite, temperature, and lactic acid bacteria on the growth of *Brochothrix thermosphacta* under anaerobic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 26, 1416–1421.
- Cowden, J. M., O'Mahony, M., Bartlett, C. L., Rana, B., Smyth, B., Lynch, D., et al. (1989). A national outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiology and Infection*, 103, 219–225.
- Dainty, R. H., Shaw, B. G., Boer, K. A. D., & Scheps, E. S. J. (1975). Protein changes caused by bacterial-growth on beef. *Journal of Applied Bacteriology*, 39, 73–81.
- Dodds, K. L., & Collins-Thompson, D. L. (1984). Nitrite tolerance and nitrite reduction in lactic acid bacteria associated with cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 163–170.
- Domínguez, M. C., Gutiérrez, L. M., López, A., Seco, F., & Zumalacárregui, J. M. (1989). Development of the principal groups of microorganisms during the ripening of chorizo sausage from León Spain. *Alimentaria*, 26, 11–15.
- EFSA (2008). Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A. *The EFSA Journal*, 135, 1–111.
- EFSA (2010). *Quantitative microbiological risk assessment on Salmonella in slaughter and breeder pigs: Final report*. VLA/RIVM/Food-DTU (Available online: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/46e.pdf>. Accessed May 4, 2012).
- EFSA (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *The EFSA Journal*, 10, 2597.
- Emberland, K. E., Nygard, K., Heier, B. T., Aavitsland, P., Lassen, J., Stavnes, T. L., et al. (2006). Outbreak of *Salmonella* Kedougou in Norway associated with salami, April–June 2006. *Euro Surveillan- ce*, 11 (Available online: <http://www.euro-surveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2995>. Accessed May 28, 2013).
- European Commission (2005). Regulation (EC) n° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L338, 1–26.
- European Commission (2011). Commission Regulation (EU) n° 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) n° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union*, L295, 1–177.
- Freese, E., Sheu, C. W., & Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321–325.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in

- the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 251–259.
- Gill, C. O., & Newton, K. G. (1977). The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 43, 189–195.
- Giltsdorf, A., Jansen, A., Alpers, K., Dieckmann, H., van Treeck, U., Hauri, A. M., et al. (2005). A nationwide outbreak of *Salmonella* Bovismorbificans PT24, Germany. *Euro Surveillance*, 10 (<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2667>). Accessed May 28, 2013).
- Hecht, S. S. (1997). Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216, 181–191.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68–76.
- Hospital, X. F., Hierro, E., & Fernández, M. (2012). Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 395–401.
- Ihnnot, A. M., Roering, A. M., Wierzb, R. K., Faith, N. G., & Luchansky, J. B. (1998). Behavior of *Salmonella* Typhimurium DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 117–121.
- Jay, J. M. (2000). *Modern food microbiology* (6th ed.). Maryland: Aspen Publishers.
- Korkeala, H., Alanko, T., & Tiusanen, T. (1992). Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33, 27–32.
- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25, 915–921.
- Leistner, L., Hechelmann, H., & Lücke, F. K. (1982). *Auswirkungen der neunten Nitrit-VO in der Mikrobiologie*, 76. (pp. 5001–5005). Kulmbach: Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, 5001–5005.
- Levine, P. B., Rose, B., Green, S., Ransom, G., & Hill, W. (2001). Pathogen testing of ready to-eat meat and poultry products collected at Federally inspected establishments in the United States, 1990–1999. *Journal of Food Protection*, 64, 1188–1193.
- Lücke, F. K. (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtschaft*, 66, 1505–1509.
- Lücke, F. K. (2000). Fermented meats. In B. Lund, T. C. Baird-Parker, & G.W. Gould (Eds.), *The microbiological safety and quality of foods*, Vol. I. (pp. 420–444). Gaithersburg: Aspen.
- Luzzi, I., Galetta, P., Massari, M., Rizzo, C., Dionisi, A. M., Filetici, E., et al. (2007). An Easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104A associated with traditional pork salami in Italy. *Euro Surveillance*, 12, 149–152.
- Neubauer, H., & Gotz, F. (1996). Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*, 178, 2005–2009.
- Nielsen, H. J. S. (1983). Influence of nitrite addition and gas permeability of packaging film on the micro flora in a sliced vacuum-packed whole meat product under refrigerated storage. *Journal of Food Technology*, 18, 573–585.
- Nygard, K., Lindstedt, B. A., Wahl, W., Jensvoll, L., Kjelso, C., Molbak, K., et al. (2007). Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to imported cured sausage using MLVA-subtyping. *Euro Surveillance*, 12, 86–87.
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2000). *Nitrite curing of meat, the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*. Trumbull: Food &

Nutrition Press Inc.

- Pontello, M., Dodano, L., Nastasi, A., & Mammì, C. (1998). A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy. *Epidemiology and Infection*, 120, 209–214.
- Porto-Fett, A. C. S., Hwang, C. A., Call, J. E., Juneja, V. K., Ingham, S. C., Ingham, B. H., et al. (2008). Viability of multi-strain mixtures of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into the batter or onto the surface of a soudjouk-style fermented semi-dry sausages. *Food Microbiology*, 25, 793–801.
- Rowe, J. J., Yarbrough, J. M., Rake, J. B., & Eagon, R. G. (1979). Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, 2, 51–54.
- Samelis, J., Aggelis, G., & Metaxopoulos, J. (1993). Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. *Meat Science*, 35, 371–385.
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1988). Hemmung des Salmonellenwachstums in frischer, streichfähiger Mettwurst ohne Zuckerstoffe. *Fleischwirtschaft*, 68, 1056–1067.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77, 136–147.
- Selgas, M. D., Sanz, B., & Ordóñez, J. A. (1988). Selected characteristics of Micrococci isolated from Spanish dry fermented sausages. *Food Microbiology*, 5, 185–194.
- Smith, J. L., Huhtanen, C. N., Kissinger, J. C., & Palumbo, S. A. (1975). Survival of *Salmonellae* during pepperoni manufacture. *Applied Microbiology*, 30, 759–763.
- Tompkin, R. B. (2005). Nitrite. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 169–236) (3rd ed.). Boca Raton: Taylor and Francis Group.
- Turantas, F., & Unluturk, A. (1993). The effect of nitrite, garlic and starter culture on the survival of *Salmonella* Typhimurium in Turkish soudjuk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 95–99.
- Ulutun, F., Sultan, N., Davutoglu, E., & Usta, D. (1988). Outbreak of food poisoning caused by *Salmonella* Typhimurium. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 22, 95–100.
- USDA/FSIS (2010). *Data-driven inspection for processing and slaughter establishments*. Public health decision criteria: United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service.
- Vignolo, G., Fontana, C., & Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of meat processing* (pp. 379–398). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Yarbrough, J. M., Rake, J. B., & Eagon, R. G. (1980). Bacterial inhibitory effects of nitrite: Inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 831–834.

Artículo 3

**Technological implications of reducing nitrate
and nitrite levels in dry-fermented sausages:
Typical microbiota, residual nitrate and nitrite
and volatile profile**

Food Control 2015, 57, 275-281



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile

Xavier F. Hospital ^a, José Carballo ^b, Manuela Fernández ^{a, *}, Jacint Arnau ^c,
Marta Gratacós ^c, Eva Hierro ^a

^a Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Productos, Laboratorio de Carne y Productos Cárnicos, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), 28040 Madrid, Spain

^c Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), 17121 Monells, Spain

Received 5 February 2015, Received in revised form 27 March 2015, Accepted 21 April 2015

Abstract

Despite the number of studies that have focused on alternatives to nitrite in meat products, it has not been found yet a single compound that performs all its functions. Therefore, nitrate and nitrite are still common additives in the meat industry. However, to reduce nitrosamine formation, both ingoing amounts and residual levels must be controlled. Dry-fermented sausages were prepared with the maximum amounts of nitrate and nitrite allowed by the European Union, 25% and 50% reduction, and no nitrate/nitrite. The concentration of these additives significantly affected Gram-positive catalase-positive cocci, which numbers were 1 and 2 log cfu/g higher in the 50% reduction and control batches, respectively. A higher amount of volatiles derived from amino acid degradation and carbohydrate fermentation was detected, related to the microbiological changes. *Enterobacteriaceae* increased during fermentation at lower nitrate/nitrite concentrations. A relation was found between ingoing and residual nitrite, which was 3.5 fold higher when the maximum amount was used in comparison to the 50% reduction.

Keywords: Residual nitrate, Residual nitrite, Dry-fermented sausages, Volatile profile, *Enterobacteriaceae*, Gram-positive catalase-positive cocci

INTRODUCTION

Dry-fermented sausages are traditionally manufactured using nitrate and nitrite. These curing salts are added as preservatives due to the antimicrobial activity of nitrite, mainly related to the inhibition of the growth of *Clostridium botulinum* and its toxin production (Sebranek & Bacus, 2007). Furthermore, nitrite has some other technological roles, such as its influence on colour and flavour formation in cured meat products (Flores & Bermell, 1996; Marco, Navarro, & Flores, 2008; Noel, Briand, & Dumont, 1990; Olesen, Meyer, & Stahnke, 2004) and its contribution to the oxidative stability of lipids, which greatly influence aroma generation (Stahnke, 1995).

However, the involvement of nitrite in the formation of nitrosocompounds, such as carcinogenic N-nitrosamines, makes the consumption of processed meats a matter of controversy (Corpet, 2011). Fresh red meat and processed meat have been associated with an increased risk of cancer, which would be related to haem iron. Among other mechanisms, haem iron would promote the synthesis of nitroso-compounds in the gastrointestinal tract; this endogenous production is caused by haem iron present in fresh meat (Cross, Pollock, & Binghamet, 2003), but it would be enhanced by the addition of nitrite to cured meats (Joosen *et al.*, 2009).

In this context, the use of nitrate and nitrite in the food industry is strictly regulated. When the link between nitrite and N-nitrosamines was found in the early 1970s, a number of studies looking for possible substitutes were published (Pegg & Shahidi, 2000). The most recent alternatives proposed include the use of vegetable extracts (i.e. celery), natural antimicrobials (i.e. lactate, bacteriocins or direct addition of bioprotective lactic acid bacteria cultures) and a strict control of the manufacturing process. Nevertheless, up to date nitrite is still unique, since it has not been found a single compound that performs all its functions. On the other hand, certain strategies that can appear as more natural to consumers, such as the use of plant extracts, involve the indirect addition of nitrate and nitrite to the product (Sebranek & Bacus, 2007).

The European Directive 2006/52/EC establishes a maximum amount of 150 mg/kg of each, nitrate and nitrite that may be added during the manufacture of dry-fermented sausages or 250 mg/kg of nitrate in long-cured products when no nitrite is

added (European Parliament, 2006). In 2007, the Danish authorities communicated their intention to maintain a more restrictive regulation (i.e. a maximum nitrite addition of 100 mg/kg to fermented salami) as they considered that the application of higher values could result in a significant rise in the intake of nitrite and thereby nitrosamines (European Commission, 2010). Considering this background, Regulation N° 1129/2011 (European Commission, 2011) mentioned the possibility to reduce in a future the current maximum inputs added to all meat products in the European Union (EU).

On the other hand, the interest of the consumers for organic meat products has increased during the last years as they are considered healthier and more natural. Regulation N° 889/2008 establishes the list of permitted additives for the production of certain organic foods within the EU (European Commission, 2008). This regulation sets an indicative ingoing amount of 80 mg/kg and a maximum residual amount of 50 mg/kg of nitrate and nitrite for organic meat products, which represents about a 50% reduction of the amount of these additives in comparison to non-organic ones.

In view of a possible change of the current European regulations, it is necessary to assess the effect of reducing the concentration of nitrate and nitrite not only in the growth of pathogens but also on other parameters that may affect the stability and quality of the product. For this purpose, chorizo, a traditional high-acid (pH < 5.5) dry-fermented sausage highly consumed in Spain and Portugal, was selected. We have analysed the typical microbiota (lactic acid bacteria, Gram-positive catalase-positive cocci, and also *Enterobacteriaceae*), the volatile profile and the residual levels of nitrate/nitrite in chorizo manufactured with the maximum amount currently allowed by the EU regulations, and with a 25% and 50% reduction.

MATERIALS AND METHODS

Sausage manufacture

Sausages were manufactured at the Research and Technology Food and Agriculture Institute (IRTA, Monells, Spain) by grinding separately lean pork (90%) (minced with a 25 mm plate) and pork belly (10%) (minced with a 12 mm plate), which were then mixed with common ingredients at 0 °C for 2 min under vacuum conditions:

NaCl (2.4%), distilled water (2%), sweet paprika (1.2%), dextrose (0.7%), sodium acid pyrophosphate (0.15%) and a commercial starter of *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* (Clerici Sacco International, Cadorago, Italy). The batter was then divided into four batches which were added with different concentrations of nitrate/nitrite dissolved in water (1% of the formula): 1) 150 mg/kg KNO₃ and 150 mg/kg NaNO₂ (high nitrate/nitrite batch, HN); 2) 112.5 mg/kg KNO₃ and 112.5 mg/kg NaNO₂ (25% reduction: medium nitrate/nitrite batch, MN); 3) 75 mg/kg KNO₃ and 75 mg/kg NaNO₂ (50% reduction: low nitrate/nitrite batch, LN) and 4) a control batch with no nitrate/nitrite (C).

All batches were mixed for 3 additional minutes under vacuum and then stuffed into 80 mm diameter collagen casings (Fibran, Sant Joan de les Abadesses, Spain) using a SIA Junior vacuum stuffer (SIA, Palau de Plegamans, Spain), resulting in sausages of ca. 400 g, which were dipped for few seconds in water containing 10 g/l of pimaricin, to prevent fungal growth. The sausages were hung vertically and allowed to reach 14-16 °C for 24 h at 70-80% relative humidity (RH). Afterwards, they were incubated at 24-26 °C and 90% RH for fermentation until pH decreased to 5.0, and dried at 12 °C and 75-80% RH for 24 days.

Sausages were sampled for microbial counts, pH, *a_w* and nitrate/nitrite determinations at days 0, 3, 14 and 27 of ripening. Volatile analysis was performed at the end of ripening.

Physico-chemical analysis

Measurement of pH was done in a homogenate prepared with an aliquot of sausage (4 g) and distilled water (10 ml), using a Crison 2001 pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain). Water activity (*a_w*) values were obtained at 25 °C from a 2 mm thick sausage slice using a dew point hygrometer Decagon CX-1 (Decagon Devices, Pullman, WA).

Microbiological analysis

Ten gram sausage samples were homogenized with 50 ml of saline solution (0.85% NaCl) for 2 min in a Stomacher 400 (Colworth, London, UK). Serial ten-fold dilutions were prepared from this homogenate.

Total viable counts (TVC) were determined on Plate Count Agar (PCA) (Pronadisa, Madrid, Spain) with 1% NaCl according to the recommendations by Dainty, Shaw, Boer, and Scheps (1975), and incubated at 32 °C for 48 h; lactic acid bacteria (LAB) were plated on double layer de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) agar at pH 5.5 and incubated at 32 °C for 48 h; Gram-positive catalase-positive cocci (GCC+) were enumerated on Manitol Salt Agar (MSA) (Pronadisa) at 32 °C for 48 h, and *Enterobacteriaceae* on double layer Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Pronadisa) incubated at 37 °C for 24 h. For the enumeration of sulphite-reducing clostridia, 1 ml of the corresponding dilution was heated at 80 °C for 10 min and then inoculated in tubes containing Sulphite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) melted agar (Pronadisa). To maintain anaerobic conditions, an overlay of sterile paraffin was added before incubating the tubes at 37 °C for 24 h. The results were expressed as cfu/g of sausage.

Determination of residual nitrate and nitrite

Residual nitrate and nitrite were determined using Flow Injection Analysis (FIA). Nitrite was determined according to the procedure described by Ruiz-Capillas, Aller-Guote, and Jiménez-Colmenero (2007). Briefly, nitrite reacts with sulphanilamide to form a diazonium salt which is added to N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (NED) to yield an azo dye compound, which absorbance is spectrophotometrically determined at 540 nm. The extract used for the analysis was prepared from 10 g of the sample according to the AOAC method (AOAC, 1990), with a final volume of 250 ml. This extract was injected into the FIA manifold to measure residual nitrite. Nitrate was determined after its reduction to nitrite using a cadmium reductor (FOSS Tecator, Sweden) placed in the FIA system (Ruiz-Capillas, Aller-Guote, Carballo, & Jiménez Colmenero, 2006). Nitrate content was estimated by the difference between the nitrite content after the reducing process and the residual nitrite.

Standard solutions with concentrations from 0.125 to 4 mg/l of nitrite and nitrate were prepared from a stock solution of 1000 mg/l.

Volatile compound analysis

The extraction of the headspace volatile compounds was done using a solid phase microextraction (SPME) device containing a fused silica fibre (10 mm length) coated with an 85 μm carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fibre (Supelco, Bellefonte, PA).

Ripened samples were ground with a commercial grinder and 4 g were transferred to a 15 ml vial, sealed with a PTFE faced silicone septum (Supelco). The vial was left for 30 min in a thermoblock (Bibby Sterilin, Stone, UK) at 40 °C for equilibration. The SPME fibre was then exposed to the headspace for 30 min while maintaining the sample at 40 °C.

The compounds adsorbed by the fibre were desorbed in the injection port of a gas chromatograph Agilent 6850 (Agilent, Santa Clara, CA) fitted with a mass spectrometer Agilent 5975C with triple-axis detector (Agilent). Helium was used as carrier gas with a linear velocity of 1 ml/min. During desorption, the injection port, held at 250 °C, was in splitless mode. The compounds were separated using a 5MS/silphenylene polysiloxane fused silica capillary column (60 m x 0.25 mm i.d., 1 mm film thickness, Quadrex Corporation, Woodbridge, CT). The chromatograph oven temperature was started at 40 °C and held for 3 min; then the temperature was increased to 280 °C at a rate of 4 °C/min and held for 5 min. The compounds were electron bombarded (70 eV electronic impact) in the mass spectrometer obtaining the corresponding mass spectra. A series of n-alkanes (C₆-C₂₂) (SigmaAldrich, St. Louis, MO) was analysed under the same conditions to obtain the linear retention index (LRI) values for the components.

Compounds were identified by first comparing their mass spectra with those contained in the mass spectral database NIST'05 (National Institute of Standards and Technology, MD, USA) and then comparing the LRI values with either those of authentic standards or with published values (Kondjoyan & Berdagué, 1996). The results were expressed in area units (AU) x 10⁻⁵.

Statistical analysis

Three trials (independent manufactures) were carried out according to the same formula and using the same technology. In each trial, two sausages per batch (C, HN, MN and LN) were taken for sampling at different ripening times. The results reported in this study are the mean obtained from all the samples analysed ($n=6$). All chemical and microbiological analyses were performed twice per sausage.

SAS version 9.4 was used for the statistical analysis. A mixed model including replication (three trials) as random term was conducted to evaluate the statistical significance ($P<0.05$) of the nitrate/nitrite concentration on each sampling day independently. Duncan's multiple range test was used for mean comparisons.

RESULTS AND DISCUSSION

pH and a_w

Figure 1 shows pH and a_w of the different batches of sausages during ripening. The pH values rapidly decreased during the fermentation stage, from 6.0 to 4.8. Then, pH increased along ripening as a consequence of the accumulation of compounds derived from protein breakdown, reaching final values around 5.0-5.2. In relation to a_w , initial values (0.96) fell to approximately 0.89 in the final product. No significant differences ($P>0.05$) were found among batches for both parameters. The pH values observed were similar to those reported by González-Fernández, Santos, Rovira, and Jaime (2006) and Herrero, Ordóñez, Romero de Ávila, Herranz, de la Hoz, & Cambero (2007) in *chorizo*. On the other hand, the final a_w values were higher than those obtained by the referred authors, but our results are still within the range considered typical for Mediterranean dry-fermented sausages (Ordóñez, Hierro, Bruna, & de la Hoz, 1999).

Microbiological analysis

The population of TVC was mainly represented by LAB. This bacterial group increased by 2.5 log cfu/g during fermentation and was the dominant microbiota until the end of the ripening (**Figure 2**). No differences ($P>0.05$) were observed between

batches and the growth pattern during the ripening was the expected for traditional Spanish fermented sausages (Cocconcelli, 2007).

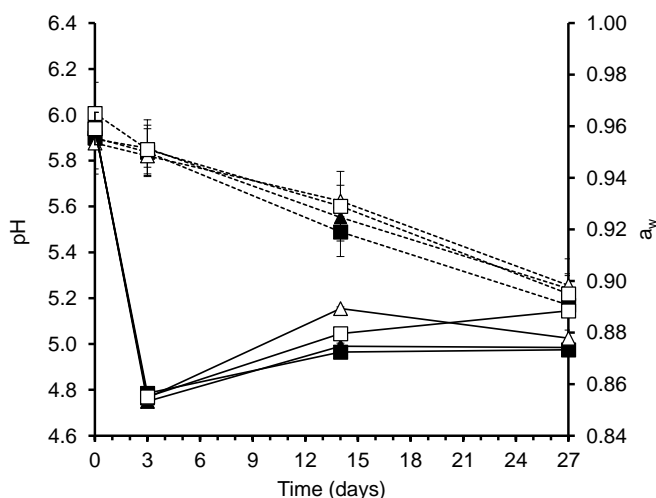


Figure 1. pH (—) and a_w (---) during ripening of *chorizo* prepared with different concentrations of nitrate and nitrite: ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation.

On the contrary, although both initial and final levels of GCC+ can also be considered as typical for this kind of sausages (Cocconcelli, 2007), a significant effect ($P < 0.05$) of the nitrate/nitrite concentration was observed (**Figure 2**), with final counts ranging from 4.7 to 6.5 log cfu/g. This microbial group includes starters that participate in the development of colour and aroma. Thus, at the end of ripening the sausages with no nitrate/nitrite (C) and those with a 50% reduction (LN) showed about 2 and 1 log cfu/g higher counts, respectively, than batches MN and HN. These results are in accordance with those observed in Spanish *salchichón* formulated with different concentrations of nitrate and nitrite (Hospital, Hierro, & Fernández, 2012). The differences in GCC+ counts between batches could be attributed to the growth features of staphylococci as a function of their nitrate- and nitrite-reducing systems and the redox potential. On the one hand, nitrate and nitrite may promote growth under low oxygen tension, i.e. in the

core of sausages (Neubauer & Götz, 1996), where nitrate acts as terminal electron acceptor and reductase activity is stimulated. However, the presence of a high nitrate concentration in the batter could at the same time neutralize this effect, since the high reductase activity would cause an excess of nitrite inside the microbial cell, which eventually could decrease the nitrite reduction/export and would slow down growth (Götz, Bannerman, & Schleifer, 2006). Additionally, staphylococci grow faster under aerobic conditions, i.e. close to the surface. A high oxygen tension diminishes reductase activity and the excess of nitrite would cause growth inhibition through interference with the respiratory chain (Rowe, Yarbrough, Rake, & Eagon, 1979).

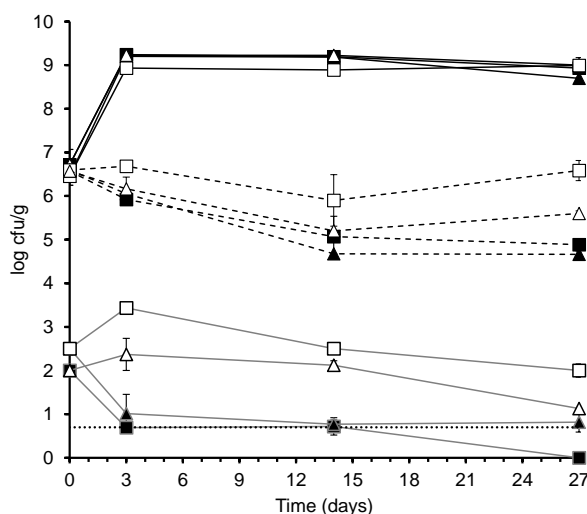


Figure 2. Changes in the typical microbiota during ripening of *chorizo* manufactured with different concentrations of nitrate and nitrite. Lactic acid bacteria (—); Gram-positive catalase-positive cocci (---); *Enterobacteriaceae* (—): ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. The dotted line represents the detection limit of the enumeration method (0.7 log cfu/g). Error bars correspond to the mean standard deviation.

Enterobacteriaceae were also significantly affected ($P < 0.05$) by the nitrate/nitrite concentration (Figure 2). During fermentation, counts decreased in batches HN and MN but they increased in batches C and LN. At the end of the process, batch C showed

about 1 log cfu/g higher counts than batches LN and MN, while the numbers of *Enterobacteriaceae* in the sausages with the highest amount of nitrate/nitrite were below the detection limit (0.7 log cfu/g). Thus, a clear inhibitory effect was exerted by nitrite in batches HN and MN during the first days of ripening when a_w was still very high and the pH decrease, which followed the typical pattern in all batches, did not inhibit microbial growth itself. Although the counts obtained at day 3 in batch LN were lower than in control samples, *Enterobacteriaceae* were still able to grow when 75 mg/kg of nitrate and nitrite were added to the batter. There is not full agreement in the literature concerning the role of nitrite on the inhibition of *Enterobacteriaceae*. Jay, Loessner, and Golden (2005) stated that nitrate and nitrite are generally ineffective against this bacterial group, including *Salmonella*, while other authors reported the inhibition of *Salmonella* Typhimurium either in vitro or in inoculated meat products (Gill & Holley, 2003; Hospital, Hierro, & Fernández, 2014). On the other hand, in a study performed in a traditional low-acid sausage (pH ca. 6) prepared with the typical ingredients of chorizo and without nitrate and nitrite, Fonseca, Cachaldora, Gómez, Franco, and Carballo (2013) reported a 4 log cfu/g increase of *Enterobacteriaceae* during the first stages of the process.

In relation to sulphite-reducing clostridia, they were not detected along ripening in any of the batches (detection limit <1 log cfu/g) (data not shown).

To summarize, the concentration of nitrate and nitrite affected the growth of GCC+ and *Enterobacteriaceae*. The first group includes starters that participate in the development of sausage colour and aroma, and the behaviour observed in this study could also have potential repercussion in pathogens such as *Staphylococcus aureus*, if this bacterium were present in the batter. On the other hand, other pathogens of interest in meat products are enterobacteria like *Salmonella* or *Escherichia coli*. Nitrite is not the unique factor that controls the growth of all these pathogens but it is especially relevant in the first stages of the ripening. Therefore, if nitrate/nitrite concentration is reduced and/or other hurdles fail, the microbiological risk would be increased.

Changes in the levels of residual nitrate and nitrite

Figure 3 shows the changes in residual nitrate and nitrite concentration during ripening. The recovery of these additives immediately after formulation was about 71-82% of the ingoing amounts. These values were higher than those obtained by Li, Shao, Zhu, Zhou, and Xu (2013), who detected about 50-70% of the nitrite added to dry-cured sausages. Fernández-López, Sendra, Sayas-Barberá, Navarro, and Pérez-Álvarez (2008) and Carballo and Andrade (2013) also reported lower detection values in Spanish dry-fermented sausages.

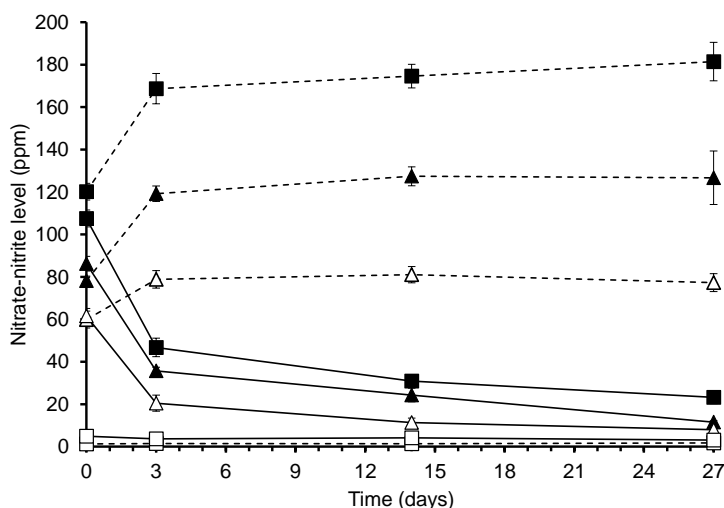


Figure 3. Changes in the residual nitrate (---) and nitrite (—) levels during ripening of *chorizo* prepared with different concentrations of nitrate and nitrite: ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation.

The concentration of residual nitrite sharply decreased during fermentation, reaching values of approximately 30% of the initial nitrite added to all the batches. After fermentation, residual nitrite continued to decrease at a lower rate, reaching at the end of the ripening values between 7 and 25 mg/kg, corresponding to 9-17% of the initial input. Cassens (1990) and Honikel (2008) reported residual nitrite levels ranging from

5 to 20% with respect to the initial amount added to meat products. This decrease has also been observed in other dry-cured meat products (Fernández-López *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). According to the opinion adopted by the EFSA (2003), the residual level of nitrite in cured meat products is not clearly related to the concentration added; however, in our study, batch HN, manufactured with the maximum ingoing amount of nitrite allowed by the EU, showed a significantly higher residual level at the end of ripening in comparison to the other batches, in the order of 2-3 times. Higher residual nitrite values could give the chance to the formation of more N-nitrosamines in the product, especially if it is going to be heated, i.e. as a pizza topping. In the case of non-heated dry-fermented sausages, De Mey *et al.* (2014) studied the content of N-nitrosamines in a wide variety of European dry-fermented sausages, including *chorizo*, and reported levels below 5.5 mg/kg; these authors assumed that the low concentrations detected could be due to the low median concentrations of residual nitrite and nitrate remaining in the screened products, lower than 20 mg/kg each.

Contrary to nitrite, nitrate levels increased during fermentation by 6-13% with respect to the initial nitrate added, corresponding to a 25-33% increase in terms of the nitrate level detected in the formula. These values remained stable until the end of ripening.

The net changes in the nitrate and nitrite concentrations in dry fermented sausages depend on the balance between reduction reactions, nitrite oxidation and nitrite binding to proteins, lipids and other meat components. According to Cassens (1990) and Honikel (2008), approximately 20-30% of nitrite in meat products is bound to proteins and 1-15% to lipids. Reduction reactions may be mediated by microorganisms and reducing agents. Staphylococci and other GCC+ are efficient nitrate reducing organisms (Gøtterup *et al.*, 2007), and for this reason they are used as starters for the development of the typical colour of cured meat products, through the binding of nitric oxide to myoglobin. These microorganisms are mainly active during the first stages of the ripening, until LAB are well established and create acidic conditions. In principle, the reductase activity of GCC+ would be then reflected in a decrease of residual nitrate during fermentation; however, in our study this effect would be masked by nitrite oxidation due to oxygen remaining in the batter after stuffing, which caused a

net increase of nitrate until day 3 of ripening. It has been reported in the literature that 10-40% of nitrite added to meat products is oxidized to nitrate (Honikel, 2008). Additionally, the low pH attained after fermentation would also contribute to inhibit nitrate-reducing bacteria. Moreover, an excess of nitrite would cause feedback inhibition of nitrate reductases and therefore contribute to higher nitrate levels (Stahnke, 1995).

The decrease pattern in the nitrite concentration observed along ripening was similar in the three batches added with this compound, and would be related to the initial ingoing amounts rather to a microbial effect. Nitrite reductase activity may not be present in all staphylococci strains and, in any case, it is considerably lower than nitrate reductase activity (Gøtterup *et al.*, 2007). Furthermore, in our study the differences in GCC+ counts along ripening among batches HN, MN and LN were only observed at the end of the process, and they were not very noticeable anyway. Therefore, the decrease in residual nitrite observed in this work would be caused by oxidation to nitrate, as mentioned above, together with its chemical conversion to nitric oxide (Møller & Skibsted, 2007), which is highly reactive and binds to myoglobin and other meat components (Cassens, 1990; Honikel, 2008).

Volatile compound profile

Fifty-two volatile compounds were identified and quantified in the headspace of the sausages at the end of ripening, which were classified according to their principal origin (**Table 1**). Most of the volatiles have been previously identified in chorizo (Ansorena, Gimeno, Astiasarán, & Bello, 2001; Mateo & Zumalacárregui, 1996), however the scarce presence of sulphur compounds in our samples -which have been reported to be about 20% of the volatile compounds in this product- would be explained by the absence of garlic in the formula. This ingredient was not added to the batter for a better assessment of the effect of nitrate/nitrite concentration in the development of aroma compounds.

Carbohydrate-fermentation derived volatiles were the most abundant group (87-93%) in all the batches, while those deriving from amino acid degradation represented only about 1-3%. The addition of lower levels of nitrate/nitrite increaset the concentration of both groups of compounds and also the total levels. These differences could

Table 1

Volatile compounds (area units $\times 10^{-5}$) identified in the headspace of *chorizo* prepared with different concentrations of nitrate and nitrite (end of ripening).

LRI ^a	Compound	Batch			
		HN ^b	MN ^b	LN ^b	C ^b
	<i>Amino acid catabolism</i>	59a	214b	304c	722d
	Dimethyl sulfide	8a	73c	14a,b	19b
536	Carbon disulfide	1a	67c	2a	41b
631	2-Methyl-1-propanol	4b	4b	1a	1a
668	3-Methylbutanal	6	10	6	8
671	Propanoic acid	4	4	9	nd
676	2-Methylbutanal	3a	4a	4a	12b
730	4-Methyl-2-pentanone	3a	6a	11b	41c
735	2-Methylpropanoic acid	nd	nd	77a	176b
736	3-Methyl-1-butanol	13a	24b	21b	33c
740	2-Methyl-1-butanol	5	5	3	4
762	Dimethyl disulfide	3a	7b	1a	32c
816	3-Methylbutanoic acid	1a	6a	135b	334c
828	2-Methylbutanoic acid	nd	nd	14	15
996	Benzaldehyde	7	6	6	7
	<i>Carbohydrate fermentation</i>	6558a	7578b	13764c	21421d
	2-Propanone	107a	130b	265c	607d
	Ethanol	25a	107b	99b	97b
604	2,3-Butanedione (<i>diacetyl</i>)	1187a	1304b	2864c	3910d
649	Acetic acid	3909a	4191a	5034b	5667c
724	3-Hydroxy-2-butanone (<i>acetoin</i>)	1263a	1791b	5419c	10963d
764	Butanoic acid	60	47	62	67
769	2,3-Butanediol	7a	9a	21b	109c
	<i>Lipid oxidation</i>	343a	378a	332a	452b
	<i>Aldehydes</i>	15a	16a	16a	49b
696	Pentanal	1	1	nd	3
802	Hexanal	3a	4a	3a	24b
1005	Octanal	3	2	3	6
1059	2-Octenal	nd	nd	nd	2
1105	Nonanal	9	9	10	14
	<i>Hydrocarbons</i>	205a	223a,b	204a	244b
	Pentane	4a	12b	4a	2a
600	Hexane	20a	27a,b	15a	33b
800	Octane	157a	165a	171a,b	187b
1000	Decane	24b	19a,b	14a	21a,b

Table 1 (continued)

LRI ^a	Compound	Batch			
		HN ^b	MN ^b	LN ^b	C ^b
	<i>Alcohols</i>	91b	90b	72a	107c
560	1-Propanol	13b	8a	7a	11a,b
665	1-Butanol	12	10	10	12
767	1-Pentanol	6b	5b	2a	7b
866	1-Hexanol	21b	19b	9a	26c
905	2-Butoxyethanol	39a	48b	44a	52b
	<i>Ketones</i>	26a	42b	29a	43b
695	2-Pentanone	12a	32b	14a	31b
950	Butyrolactone	14b	10a	15b	11a
	<i>Furans</i>	6	7	11	10
811	2,3,5-Trimethylfuran	nd	nd	2	1
1040	3-Pentylfuran	6	7	10	9
	Microbial esterification	102b,c	150c	72b	12a
515	Methylacetate	9a	72b	16a	12a
615	Ethylacetate	93b	79a,b	56a	nd
	Spices	351b	287a	475c	346b
865	1,4-Dimethylbenzene (<i>p</i> -xylene)	3	3	5	5
972	Sabinene	4a	4a	10b	5a
990	β-Myrcene	15a	13a	22b	23b
1016	3-Carene	35a	34a	59b	40a
1021	<i>o</i> -Cymene	109b	84a	129c	90a
1031	Limonene	174b	139a	232c	170b
1034	β-Phellandrene	12	10	17	14
	Unknown origin/Miscellaneous	66	143	70	95
	2-Propanol	25a	80b	23a	20a
677	1-Methoxy-2-propanol	2	3	3	3
778	Methyl benzene (<i>toluene</i>)	37a	59b	43a	69b
959	Hexanoic acid	2	1	1	3
	Total	7479a	8750b	15017c	23048d

a, b, c, d: values in a row with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

^a Linear retention index on a 5MS/silphenylene polysiloxane column.

^b Batch HN: high nitrate/nitrite; Batch MN: medium nitrate/nitrite; Batch LN: low nitrate/nitrite; Batch C: no nitrate/nitrite.

be explained by the effect of nitrate and nitrite concentrations on GCC+. As mentioned above, the counts of this bacterial group were higher in the sausages manufactured with lower levels of curing agents. The starter *S. xylosus* produces acetic acid, acetoin and

diacetyl from carbohydrate fermentation (Stahnke, 1999). Acetoin and diacetyl were among the most abundant volatiles of this group. These compounds impart a buttery odour and, in the case of diacetyl, also a characteristic sweet note. The low sensory threshold of diacetyl, about 4 mg/l (Rychlik, Schieberle, & Grosch, 1998), together with the levels detected in our study could be considered of relevance for the final aroma. Schmidt and Berger (1998) reported that acetoin and diacetyl possibly contribute to the typical final flavour of salami. In our study, in which *S. xylosus* was used as starter, acetic acid accounted for 24-52% of the total volatiles; acids have been reported to be the principal group in *chorizo* (Ansorena *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 1996). Additionally, *S. xylosus* is also able to degrade the amino acids valine, isoleucine and leucine and form 2-methylpropanal and 2- and 3-methylbutanal, respectively, and their corresponding alcohols and acids (Stahnke *et al.*, 1999), which have been also associated to the ripened aroma of cured meat products (Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 1999). Nitrate and nitrite have been reported to affect not only growth, but also metabolism of the staphylococci used as starters in dry-fermented sausages (Marco, Navarro, & Flores, 2006; Neubauer & Götz, 1996). Although it is not easy to separate both effects, according to previous studies on the production of volatile compounds, the only addition of nitrate would promote the generation of substances derived from the degradation of branched-chain amino acids, while nitrite would inhibit these metabolic reactions (Marco *et al.*, 2008; Olesen *et al.*, 2004). In our study, the higher levels of the main branched amino acid derivatives could be mainly attributed to GCC+ growth, as explained by the different numbers observed in the different batches.

The volatiles arising from lipid oxidation accounted for 2-5% of the total headspace compounds. Only the sausages with no nitrate/nitrite added showed a slight increase of lipid-derived volatiles, which would be attributed to the antioxidant role of these additives; this effect would be more noticeable in sausages with longer ripening times. Similarly, Zanardi, Ghidini, Battaglia, and Chizzolini (2004) reported a higher degree of lipid oxidation in Mediterranean style sausages lacking nitrate and nitrite in the formula. These compounds, especially aliphatic saturated aldehydes such as hexanal, greatly contribute to the aroma of dry-fermented sausages (Olivares, Navarro, & Flores, 2009).

CONCLUSIONS

The residual levels of nitrite in dry-fermented sausages found in this study were related to the concentration added to the formula. The role of these residual levels in N-nitrosamine formation should be further investigated. On the other hand, decreasing the ingoing amount of nitrate/nitrite in dry-fermented sausages affects the growth of Gram-positive catalase-positive cocci and *Enterobacteriaceae*, which are important from a technological point of view and from a food safety perspective. A future reduction of the maximum ingoing levels of nitrate/nitrite allowed by the EU in dry fermented sausages should be studied in the context of a benefit-risk balance between chemical and microbiological hazards.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Programme Consolider-Ingenio 2010, Project CSD 2007-00016). The authors also thank Universidad Complutense de Madrid (Group 920276, GR35/10A) for its financial support, and for the predoctoral grant conceded to X.F. Hospital.

REFERENCES

- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (2001). Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *Food Research International*, 34, 67-75.
- AOAC. (1990). *Official methods of analysis* (15th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemistry.
- Carballo, J., & Andrade, S. (2013). Evolución de los nitratos y nitritos durante la curación de salchichones con diferentes niveles de sales nitrificantes. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 33, 114-115.
- Cassens, R. G. (1990). *Nitrite-cured meat*. Trumbull: Food & Nutrition Press, Inc.
- Cocconcelli, P. S. (2007). Starter cultures: bacteria. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 140-146). Ames: Blackwell Publishing.
- Corpet, D. E. (2011). Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science*, 89, 310-316.
- Cross, A. J., Pollock, J. R. A., & Bingham, S. A. (2003). Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal n-nitrosation arising from red meat. *Cancer Research*, 63, 2358-2360.

- Dainty, R. H., Shaw, B. G., Boer, K. A. D., & Scheps, E. S. J. (1975). Protein changes caused by bacterial-growth on beef. *Journal of Applied Bacteriology*, 39, 73-81.
- De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M. C., et al. (2014). The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Science*, 96, 821-828.
- EFSA. (2003). The effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *EFSA Journal*, 14, 1-31.
- European Commission. (2008). *Commission Regulation (EC) n° 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) n° 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control*.
- European Commission. (2010). Commission Decision of 25 May 2010 concerning national provisions notified by Denmark on the addition of nitrite to certain meat products (2010/561/EU). *Official Journal of the European Union*, L247, 55-65.
- European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) n° 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) n° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union*, L295, 1-177.
- European Parliament. (2006). European Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L204, 10-22.
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., & Pérez-Alvarez, J. A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of "salchichón" (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 80, 410-417.
- Flores, J., & Bermell, S. (1996). Dry-cured sausages - Factors influencing souring and their consequences. *Fleischwirtschaft*, 76, 163-165.
- Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., & Carballo, J. (2013). Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiology*, 33, 77-84.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 251-259.
- González-Fernández, C., Santos, E. M., Rovira, J., & Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74, 467-475.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., & Møller, J. K. S. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 303-310.
- Götz, F., Bannerman, T., & Schleifer, K. H. (2006). The genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. In M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes* (pp. 5-75). New York: Springer Science.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Ávila, Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331-338.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68-76.

- Hospital, X. F., Hierro, E., & Fernández, M. (2012). Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 395-401.
- Hospital, X. F., Hierro, E., & Fernández, M. (2014). Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella* Typhimurium. *Food Research International*, 62, 410-415.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). New York: Springer Science.
- Joosen, A. M., Kuhnle, G. G., Aspinall, S. M., Barrow, T. M., Lecommandeur, E., Azqueta, A., et al. (2009). Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 30, 1402-1407.
- Kondjoyan, N., & Berdagué, J. L. A. (1996). *Compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds*. Theix: Laboratoire Flaveur (INRA).
- Li, L., Shao, J., Zhu, X., Zhou, G., & Xu, X. (2013). Effect of plant polyphenols and ascorbic acid on lipid oxidation, residual nitrite and N-nitrosamines formation in dry-cured sausage. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 1157-1164.
- Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*, 73, 660-673.
- Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2008). The sensory quality influence of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *European Food Research and Technology*, 226, 449-458.
- Mateo, J., & Zumalacárregui, J. M. (1996). Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Science*, 44, 255-273.
- Møller, J. K. S., & Skibsted, L. H. (2007). Color. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 203-216). Ames: Blackwell Publishing.
- Neubauer, H., & Götz, F. (1996). Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*, 178, 2005-2009.
- Noel, P., Briand, E., & Dumont, J. P. (1990). Role of nitrite in flavor development in uncooked cured meat-products - sensory assessment. *Meat Science*, 28, 1-8.
- Olesen, P. T., Meyer, A. S., & Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavour compounds in fermented sausages - the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, 66, 675-687.
- Olivares, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2009). Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage. *Food Chemistry*, 115, 1464-1472.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329-367.
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2000). *Nitrite curing of meat*. Trumbull: Food & Nutrition Press.
- Rowe, J. J., Yarbrough, J. M., Rake, J. B., & Eagon, R. G. (1979). Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, 2, 51-54.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (1999). Volatile compounds of dry cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, 19-27.
- Ruiz-Capillas, C., Aller-Guiote, P., Carballo, J., & Jiménez Colmenero, F. (2006). Biogenic amine formation and nitrite reactions in meat batter as affected by high-pressure processing and chilled storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9959-9969.

9965.

Ruiz-Capillas, C., Aller-Guiote, P., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. *Food Chemistry*, 101, 812-816.

Rychlik, M., Schieberle, P., & Grosch, W. (1998). *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. Garching: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München.

Schmidt, S., & Berger, R. G. (1998). *Aroma compounds in fermented sausages of different origins*. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 31, 559-567.

Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77, 136-147.

Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels - Part II. Volatile components. *Meat Science*, 41, 193-209.

Stahnke, L. H. (1999). Volatiles produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces. Part I. Collection and identification. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32, 357-364.

Stahnke, L. H., Friis, L., Martinussen, J., Thomsen, L. E., Jessen, B., Stolpe, E., et al. (1999). *Aroma development in fermented meat products - Staphylococcus's degradation of amino acids in relation to aroma formation, final report of a FØTEK 2 collaboration project*. Denmark: The Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., & Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, 66, 415-423.

Artículo 4

**A study on the toxigenesis by *Clostridium
botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry
fermented sausages**

En revisión (*International Journal of Food Microbiology*)

De: ees.food.0.347825.42f50652@eesmail.elsevier.com en nombre de [International Journal of Food Microbiology](#)
A: hierro@vet.ucm.es
Asunto: Editor handles your revised submission FOOD-D-15-00691R1
Fecha: jueves, 08 de octubre de 2015 13:14:24

Ref.: Revision of FOOD-D-15-00691R1

Title: A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages

Dear Ms. Hierro,

Your revised submission "A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages" will be handled by Editor In Chief Luca Coccolin, Ph.D.

You may check the progress of your revision by logging into the Elsevier Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/food/>.

Thank you for submitting your revision to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
International Journal of Food Microbiology

A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages

Xavier F. Hospital¹, Eva Hierro^{1*}, Sandra Stringer² and Manuela Fernández¹

¹ Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

² Institute of Food Research (IFR), Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR47UA, UK

Abstract

Nitrite has been traditionally used to control *Clostridium botulinum* in cured meat products. However, in the case of dry fermented sausages, environmental factors such as pH, a_w and the competitive microbiota may exert a more relevant role than nitrite in the inhibition of the growth and toxin production by *C. botulinum*. In this challenge test study, two varieties of Mediterranean dry sausages (*salchichón* and *fuet*) were inoculated with spores of *C. botulinum* Group I (proteolytic) and *C. botulinum* Group II (nonproteolytic). Sausages were prepared with 150 mg/kg NaNO_3 and 150 mg/kg NaNO_2 (maximum ingoing amounts allowed by the European Union regulation), with a 25% and 50% reduction, and without nitrate/nitrite. The initial pH in both products was 5.6, and decreased to values below 5.0 in *salchichón* and to 5.2 in *fuet*. Lactic acid bacteria counts reached 8-9 log cfu/g after fermentation. The a_w decreased from initial values of 0.96 to about 0.88-0.90 at the end of ripening. Botulinum neurotoxin was not detected in any of the sausages, including those manufactured without nitrate and nitrite. Despite the environmental conditions were within the range for germination and growth of *C. botulinum* Group I during the first 8 days of the ripening process in *fuet* and 10-12 days in *salchichón*, acidity, a_w and incubation temperature combined to inhibit the production of toxin, independently of the concentration of curing agents. Although decreasing or even removing nitrate/nitrite from the formula did not compromise safety regarding *C. botulinum* in the conditions tested in this study, their antimicrobial role should not be underestimated in the case that other hurdles could fail or other ripening conditions were used, and also considering the effect of nitrite on other pathogens.

Keywords: *salchichón*; *fuet*; *Clostridium botulinum* Group I; *Clostridium botulinum* Group II; spores

INTRODUCTION

Mediterranean style dry sausages are based on a combination of meat curing and and drying, together with fermentation in most cases. Their long shelf life is a consequence of successive factors or hurdles, such as the addition of nitrite and salt, the low pH due to the growth of lactic acid bacteria (LAB), a low redox potential and intermediate water activity (a_w) (Leistner, 1995).

Nitrate and nitrite are commonly used additives in cured meats because of their technological contribution to the oxidative stability of lipids and to the typical flavour and colour development, which can be achieved with the addition of approximately 40-50 mg/kg of nitrite (Sebranek and Bacus, 2007). Moreover, a key role on the inhibition of the Gram-positive spore-forming anaerobic bacteria *Clostridium botulinum* has been attributed to nitrite. Such inhibition is the result of the interaction between nitric oxide derived from nitrite and clostridial iron-sulphur proteins, such as ferredoxin and ferredoxin-pyruvate oxidoreductase, resulting in a rapid decrease of intracellular ATP and pyruvate accumulation (Tompkin, 2005; Woods and Wood, 1982).

Raw sausage mixtures may contain significant numbers of spore-forming bacteria, with spices being a major source (ICMSF, 2005). However, germination and growth, and also toxin production, will depend on environmental factors such as pH and a_w . The role of nitrite in the inhibition of *C. botulinum* in cured meat products remains controversial. Some authors state that toxin formation is hardly probable, especially in European-type fermented sausages due to their low pH and a_w (Lücke, 2000), while other studies consider that nitrite appears to be necessary, especially in traditional dry fermented sausages with a mild pH drop (EFSA, 2003).

Four physiologically distinct groups of *C. botulinum* have been described, with Group I (proteolytic) and Group II (nonproteolytic) responsible for virtually all cases of foodborne botulism (Peck, 2006). *C. botulinum* Group I produce botulinum neurotoxin (BoNT) types A, B and/or F; their growth is inhibited at 10 °C or below, at $\text{pH} \leq 4.6$, in the presence of 10% NaCl or at a_w below 0.94. *C. botulinum* Group II strains produce BoNT types B, E, or F, are able to grow and form toxin at 3 °C, but they do not grow or form

neurotoxin at pH<5 and at NaCl concentration above 5%, and at a_w below 0.97 (Johnson, 2013; Lund and Peck, 2000).

Despite the relevant technological and safety functions of nitrite, there is great concern regarding its role in the formation of N-nitrosamines (Pegg and Shahidi, 2000). Balancing the risks and the benefits of using nitrate and nitrite, EU Regulation nº 1129/2011 establishes the maximum amount of these additives that may be added during manufacturing of cured meat products (European Commission, 2011), which for dry fermented sausages is 150 mg/kg of nitrate and 150 mg/kg of nitrite, or for long ripening sausages, 250 mg/kg of nitrate if nitrite is not added. However, consumer demands for healthier products, with less additives, together with the request by some EU member states to maintain its more restrictive regulations, could result in a future revision of the current levels of nitrate and nitrite allowed in the manufacture of meat products. Even if the presence of spores of *C. botulinum* in meat is generally low (<1-10 spores/kg) (Dodds, 1993), and their growth is naturally inhibited by the different hurdles in dry sausages, the safety of a product has to be re-evaluated when modifying the formulation, the process or storage conditions (EFSA, 2005). It has been reported that very low amounts of preformed toxin in foods i.e. 30-100 ng result in a severe and deadly intoxication (Peck, 2009).

The aim of this work was to investigate toxin production by *C. botulinum* Group I and *C. botulinum* Group II in two Mediterranean-style dry sausages with different pH values and manufactured with different concentrations of nitrate and nitrite.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of spores

Two different cocktails of *C. botulinum* spores were prepared. Cocktail 1 contained spores of 3 Group I type A strains (62A, Eyemouth and ATCC 3502); cocktail 2 contained spores of six Group II strains: 3 type B strains (Eklund 2B, CDC 3875 and Kapchunka B2) and 3 type E strains (Beluga, Dolman VH and CDC 7854). The strains chosen had been isolated from a range of different materials, on different continents over many decades (**Table 1**).

Table 1*Clostridium botulinum* strains included in the study.

Strain	Group	Toxin type	Toxin titre (ng/ml)*	Initial isolation	Present source
ATCC 3502	I	A	>100	California, USA, early 1920s	CAMR, 2000
Eyemouth	I	A	10	?	TRS 1993
62A	I	A	>100	Canned food, USA, pre1948,	IFR, 1993
Eklund 2B	II	B	>25	Pacific sediment, USA, 1965	UR, 1983
CDC 3875	II	B	>25	Human stool, Iceland, 1981	CDC 1987
Kapchunka B2	II	B	10	Kapchunka, USA, 1981	NFPA, 1993
Beluga	II	E	>100	Fermented Beluga whale, USA, 1950	UR, 1981
Dolman VH	II	E	>100	Pickled herring, Canada, 1949	CDC, 1987
CDC 7854	II	E	>100	Fish, Egypt, 1991	CDC, 1993

CAMR = Centre for Applied Microbiology and Research; TRS = L. Taylor, Torrey Research Station; IFR = T. Roberts, Institute of Food Research, UK; UR= J. Crowther, Unilever Research, UK; CDC = C. Hatheway, Centers for Disease Control, USA; NFPA = V. Scott, National Food Processors Association, USA.

* Toxin concentration of culture supernatant was measured by ELISA against dilutions of toxin standard (Metabio Inc., Woburn, MA, USA).

Stock spore suspensions that had been produced in a two-phase medium of water over cooked meat agar as described by Peck *et al.* (1992) were used. These spores had been stored at 2 °C aerobically in water. Before use, the spore preparations were enumerated and tested for toxin production and proteolytic activity. All the spore suspensions were observed microscopically to check they still contained a high proportion of phase bright spores. Each suspension was enumerated by growth on pre-reduced Peptone Yeast Extract Glucose Starch agar (PYGS, Oxoid) after incubation at 30 °C for 3 days under H₂/CO₂ (90:10). All suspensions contained more than 10⁸ viable spores/ml. To determine any aerobic contamination, spores were aerobically incubated on Tryptone Soya Agar plates (TSA, Oxoid) at 30 °C for 2 days. Each strain was also tested for its ability to produce toxin in standard culture media pH 6.8 incubated at 30 °C for 24 h, using the same ELISA method as was used for the sausage samples (**Table 2**). Proteolytic activity was assessed by the ability to digest casein on pre-reduced Reinforced Clostridial Medium (RCM) (Oxoid, Basingstoke, UK) plates containing 5% (w/v) skim milk powder, which were incubated at 30 °C for 3 days under H₂/CO₂ (90:10).

To prepare the inocula, the spores were diluted in 0.85% saline solution and mixed to give separate cocktails for *C. botulinum* Group I and *C. botulinum* Group II each with a final concentration of 7 log spores/ml comprised of equal numbers of spores of each constituent strain.

Table 2

Ingredients (%) and starters used for the manufacture of the experimental sausages.

	<i>Salchichón</i>	<i>Fuet</i>
Lean pork	60	60
Pork back fat	40	40
NaCl	2.4	2.2
Lactose	3	-
Dextrose	0.5	0.1
Ground black pepper	0.25	0.3
Water	1	0.7
Starters	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>Penicillium candidum</i>

Preparation of the starter cultures

For *salchichón*, a combination of *Lactobacillus plantarum* CECT 220, *Staphylococcus xylosus* CECT 237 and *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 was used as starter cultures. All the strains were obtained from the Spanish Collection of Type Cultures (CECT, Valencia, Spain). The two staphylococci and the lactobacilli were grown at 37 °C in Tryptone Soy Broth (TSB) (Pronadisa, Madrid, Spain) and in pH 5.7 Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Pronadisa), respectively, to reach the stationary growth phase.

A commercial *Penicillium candidum* culture (Ascott Smallholding Supplies, Newton Abbot, UK) was used for surface inoculation of *fuet*.

Preparation of sausages

Two traditional varieties of Mediterranean-style dry sausages were selected, *salchichón* and *fuet*. Both products are based on lean pork (or pork and beef mixtures) together with pork back fat and pepper as characteristic spice. *Salchichón* reaches a

lower pH due to lactic acid fermentation, which is promoted by the addition of sugars and the use of an initial ripening temperature above 20 °C. *Fuet* is characterized by a higher pH resulting from the control of fermentation at a lower initial temperature (usually below 15 °C) and avoiding the addition of lactic acid starters and sugars. Furthermore, *fuet* usually has a smaller diameter than *salchichón* and presents a typical white coating due to fungal growth.

In our study, sausages were manufactured with a mixture of lean pork and pork back fat prepared in a mincer equipped with a 5 mm hole diameter plate. The mixture was divided into four batches to which different nitrate/nitrite concentrations were added: batch 1) 150 mg/kg NaNO₃ and 150 mg/kg NaNO₂ (high nitrate/nitrite batch, HN), at present this is the maximum amount allowed by the EU for products to be ripened for less than 30 days; batch 2) 112.5 mg/kg NaNO₃ and 112.5 mg/kg NaNO₂ (25% reduction: medium nitrate/nitrite batch, MN); batch 3) 75 mg/kg NaNO₃ and 75 mg/kg NaNO₂ (50% reduction: low nitrate/nitrite batch, LN); and batch 4) control sausages with no nitrate/nitrite added (C). Once the batches were obtained, both *C. botulinum* Group I and *C. botulinum* Group II spore cocktails were added to each batch to reach a concentration of 4 log spores/g, followed by manual mixing.

Afterwards, the formula of *salchichón* was completed by adding water, NaCl, dextrose, lactose and ground black pepper (**Table 2**). The starter culture was added in a proportion 1:1:1 to reach an approximate concentration in the batter of 5 log cfu/g. *Salchichón* with no starter added were also manufactured to check possible differences in the progress of fermentation. After a second mixing step, the batters were stuffed into 65 mm diameter collagen casings (Fibran, Sant Joan de les Abadesses, Spain), resulting in sausages of approximately 400 g, which were sprayed with 20% potassium sorbate to avoid the growth of superficial moulds. The sausages were fermented and dried for 28 days under the following conditions: 2 days at 22 °C and 90% relative humidity (RH), 24 h at 19 °C and 88% RH, 24 h at 15 °C and 86% RH, and 24 days at 12 °C and 84% RH. Sampling was carried out at days 0, 3, 14, and 28 of ripening.

Fuet was formulated with water, NaCl, dextrose and ground black pepper (**Table 2**). The batters were stuffed into 40 mm diameter collagen casings, resulting in sausages of about 200 g, which were dipped in the starter *P. candidum* suspension

prepared according to manufacturer' instructions. The sausages were ripened for 20 days under the following conditions: 6 days at 15 °C and 85% RH and 14 days at 12 °C and 75-80% RH. Sampling was performed at days and 0, 7, 14, and 20 of ripening.

Physico-chemical analyses

Measurements of pH were done using a Thermo Scientific Orion 3-star benchtop pH-meter with spear-tip double junction pH electrode VWR 662-0084 (Fisher Scientific, Loughborough, UK) by introducing the electrode in the centre of the sausage. The a_w was measured in the inner part of the sausages using a dew point hygrometer Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Pullman, WA) at 20 °C. All the determinations were performed in duplicate.

Microbiological analysis

Samples of 80 g, taken from the inner part of the sausages, were transferred to a Stomacher bag and homogenized with 80 ml of 1% gelatin-phosphate buffer (pH 6.2) for 2 min in a Seward stomacher 400 (Seward, Worthing, UK). Ten-fold dilution series were prepared from this homogenate in 9 ml of 0.85% saline solution.

Total viable counts (TVC) were enumerated on Plate Count Agar (PCA, Oxoid) with 1% NaCl, and incubated at 32 °C for 48 h. Lactic acid bacteria (LAB) were plated on double layer de Mann, Rogosa and Sharpe agar (MRS, Oxoid) at pH 5.7 and incubated at 32 °C for 48 h. The results were expressed as log cfu/g. The analyses were done in duplicate.

Toxin determination

The stomacher homogenates prepared as described above were centrifuged (15,000 x g, 10 min, 10 °C) and the supernatants filtered through nitrocellulose membrane filters of 0.2 µm pore size (Whatman, Maidstone, UK). The filtrate was then diluted (1:5) (v/v) in gelatin-phosphate buffer and kept frozen until analysis, for which the extracts were thawed overnight at 2 °C.

Toxin was tested using a modification of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) described by Ferreira *et al.* (2003). Briefly, 96-well plates were coated

with 100 µl/well of anti-A, anti-B or anti-E capture antibody (Metabionics, Madison, WI) at a concentration of 1 µg/ml in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 (Fisher Scientific, Loughborough, UK), followed by 3 h incubation at 37 °C. The excess antibody solution was discarded and the plates were blocked by adding 200 µl/well of 2% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) in PBS. After an overnight incubation at 2 °C, the antibody-coated plates were washed 5 times with Phosphate-Buffered Saline-Tween (PBST) (Sigma-Aldrich). One hundred µl of the sample extracts, a blank extract prepared from non inoculated batter (as a negative control), PYGS broth in which *C. botulinum* had grown (as a positive control) and botulinum neurotoxin (BoNT) standards (Metabionics, Madison, WI) was added to the different plate wells. Toxin standard curves with concentrations from 10 to 10,000 pg/ml were obtained by diluting stock complexes of BoNT in an extract prepared from non-inoculated batter (blank extract). Plates were incubated overnight at 2 °C, and then washed 5 times with PBST, followed by the addition of 100 µl/well of biotinylated detector antibody (1 µg/ml in 2% BSA/PBS). After incubation at 37 °C for 2 h, the plates were again washed 5 times in PBST and 100 µl of streptavidin-horseradish peroxidase enzyme conjugated (Europa Bioproducts, Cambridge, UK) (diluted 1:10,000 in 2 % BSA/PBS) was added. The plates were then incubated at 37 °C for 1 h and, after a final washing step, a substrate solution containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) was added (100 µl/well). The colour reaction was stopped by adding 50 µl of 0.3 M H₂SO₄, and the absorbance was measured at 450 nm on a FLUORstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The limit of detection was 0.1 ng/g for BoNT B and 1 ng/g for BoNT A and E. The toxin determinations were performed in duplicate.

Statistical analysis

A one-way ANOVA was conducted to compare microbial and physicochemical results at different concentration of nitrate/nitrite, using Statgraphics Centurion XVI.I (Statpoint Technologies, Warrenton, VA). Statistical significance was identified at 95% confidence level.

Two trials (independent manufactures) were carried out according to the same formula and using the same technology. In each trial, two sausages per batch (C, HN,

MN and LN) were taken for sampling at different ripening times. The results reported in this study are the mean obtained from all the samples analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

As it has been mentioned in the Introduction, there are several factors in the inner sausage environment that can control the growth of *C. botulinum*, mainly pH, a_w , the presence of competitive microbiota and added preservatives. Maximum and minimum limits for these parameters have been established, although they seldom act independently but usually in concert, often showing synergistic effects (Johnson, 2013). Another factor that may greatly influence the growth of *C. botulinum* in foods is temperature. In principle, the ripening conditions used in our study would be more favourable for the growth of *C. botulinum* Group II strains (optimum temperature 28-30 °C and minimum temperature 3-4 °C) (EFSA, 2005), although ripening temperatures would also allow the multiplication of *C. botulinum* Group I (minimum temperature 10-12 °C).

Since botulism is most often associated with home and traditional manufacture (in which fermentation relies on the indigenous microbiota) or a failure in the industrial production (EFSA, 2005; Lebert *et al.*, 2007), toxin formation by *C. botulinum* was tested with and without the presence of LAB starter cultures in *salchichón*. *Fuet* was prepared without any LAB starter since this is the traditional production procedure. LAB accounted for approximately 90% of TVC in both products, either with or without the addition of starter, with levels of 5.5 log cfu/g in the batter of *salchichón* added with starter and 3.5 log cfu/g in *salchichón* without starter and *fuet* (**Figures 1 and 2**). During fermentation, the LAB numbers rapidly increased to about 8-9 log cfu/g, independently of the initial counts. *C. botulinum* is a poor competitor in the presence of LAB largely by reducing pH but also by the production of bacteriocins (Johnson, 2013). The high numbers of LAB observed in our study could have contributed to the inhibition of this pathogen.

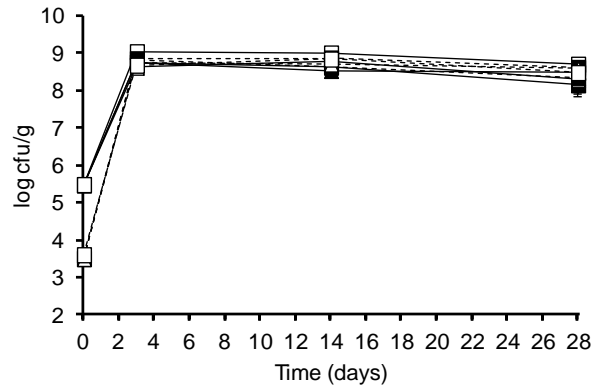


Figure 1. Changes in LAB counts during the ripening of *salchichón* prepared with (—) and without (---) starter culture and with different concentrations of nitrate and nitrite: ■ batch HN, high nitrate and nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; Δ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation. (n=4).

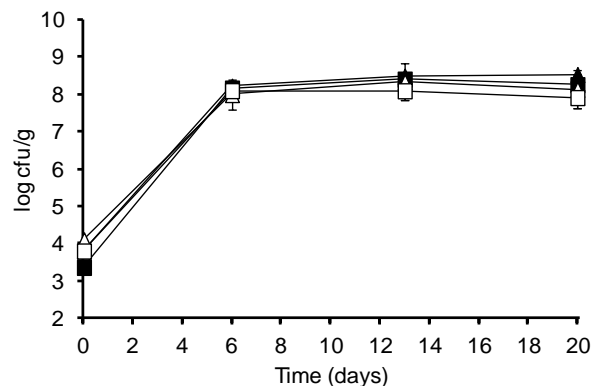


Figure 2. Changes in LAB counts during the ripening of *fuet* prepared with different concentrations of nitrate and nitrite: ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; Δ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation. (n=4).

In *salchichón*, the rapid growth of LAB, and the subsequent production of lactic acid, reduced pH during fermentation from 5.6 to 4.8-5.0 in all batches either with or without starter (**Figure 3**). The minimum pH allowing growth of *C. botulinum* Group I

and *C. botulinum* Group II has been reported to be 4.6 and 5.0, respectively (Lund and Peck, 2000). Therefore, growth of *C. botulinum* Group II strains would be inhibited after fermentation, while the pH remained within the theoretical growth range of *C. botulinum* Group I during the whole ripening period. However, it has been shown that the probability of growth of *C. botulinum* Group I decreases below pH 5 even in ideal condition (Lund *et al.*, 1987) and this effect is likely to be exacerbated when combined with other preservative factors. Fermented meats have historically prevented the growth of a wide range of pathogens due to rapid acidification. Traditional fermentations are difficult to control and may result in a slow pH decrease, which could favour the growth of *C. botulinum* (EFSA, 2005). Although in our study, no differences between *salchichón* batches were observed in the pH behaviour during the first days of the process, the use of starter cultures would be desirable to ensure rapid carbohydrate fermentation. On the other hand, the pH decrease was less marked in *fuet*, reaching values *ca.* 5.2 during the first days of ripening and even showing a slight increase at the end of the process (**Figure 4**). These pH values are within the growth ranges of both Group I and Group II *C. botulinum* strains. In these circumstances the combination with other hurdles becomes critical.

The a_w slowly decreased from initial values of 0.96 to about 0.88-0.90 at the end of ripening (**Figures 3 and 4**). These values are typical in Mediterranean sausages (Hierro *et al.*, 2014). The limiting a_w using NaCl as the humectant is 0.94 for *C. botulinum* Group I and 0.97 for Group II (Johnson, 2013). Therefore, Group II strains would likely be inhibited by a_w from the beginning of the process in both products, to which pH of *salchichón* would also contribute after fermentation. On the contrary, *C. botulinum* Group I would be able to grow until approximately day 8 in *fuet* and day 10-12 in *salchichón*. It should be noted that the incubation conditions were not ideal, in particular the incubation temperature of 15 °C used for *fuet* is close to the limit for growth of *C. botulinum* Group I.

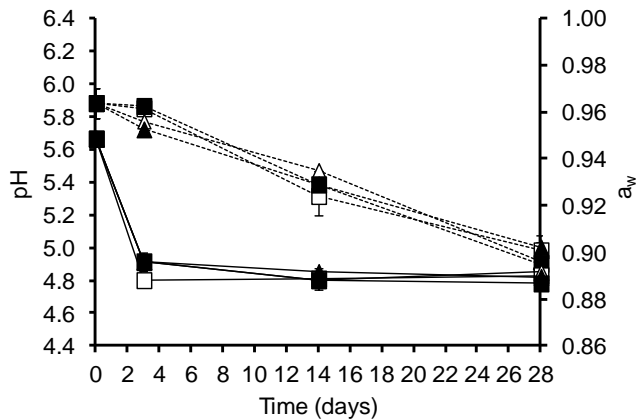


Figure 3. Changes in pH (—) and a_w (- - -) during the ripening of *salchichón* prepared with starters and different concentrations of nitrate and nitrite: ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation. (n=4).

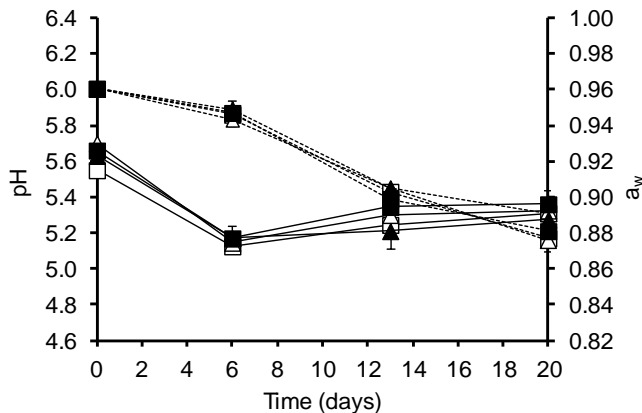


Figure 4. Changes in pH (—) and a_w (- - -) during the ripening of *fuet* prepared with different concentrations of nitrate and nitrite: ■ batch HN, high nitrate/nitrite; ▲ batch MN, medium nitrate/nitrite; △ batch LN, low nitrate/nitrite; □ batch C, no nitrate/nitrite. Error bars correspond to the mean standard deviation. (n=4).

Considering only the pH and a_w of the sausages, there appears to be potential for germination and growth of *C. botulinum* Group I during the initial stages of the

production process such that nitrate/nitrite levels might play a relevant role in product safety. In previous challenge test studies carried out in dry sausages, it was reported that the presence of nitrate/nitrite represented an essential hurdle to control *Listeria* and *Salmonella* when limiting pH and a_w were not fully established or even at values below those considered as minimum for growth (Hospital *et al.*, 2012, 2014). However, in the present study BoNT was not detected in any of the samples analysed, even in the sausages prepared without nitrate and nitrite (control batch). These results indicate that either the combination of inhibitory factors (pH, a_w , temperature and competitive microbiota) was sufficient to prevent growth, or at least the time during which the conditions were favourable for germination and subsequent growth was not long enough for toxin to be produced. There is great variability in the time needed by spores to become an active cell ready to duplicate and it depends on both spore history as well as the prevailing current environmental conditions whereas the rate of exponential growth is more consistent and directly related to the prevailing conditions. Using the ComBase Predictive database (www.combase.cc), the estimated doubling time for *C. botulinum* Group I at 22 °C, pH 5.6 and a_w 0.96, the initial prefermentative conditions in *salchichón*, was 81 h, while after fermentation (19 °C, pH 4.8 and a_w 0.95) the doubling time would be 544 h. This means that even if growth were possible and ignoring any additional lag phase associated with the spores, the possibility of any increase in cell numbers would be negligible. Similarly in *fuet*, using initial ripening conditions where the potential for growth would be the greatest, the predicted doubling time of *C. botulinum* Group I is 263 h at 15 °C, pH 5.6 and a_w 0.96, which is longer than the fermentation time. Nitrite could also contribute to delay *C. botulinum* growth, since it has been reported that inhibits outgrowth and cell division (Tompkin, 2005; Woods and Wood, 1982), rather than spore germination itself (Sofos, Busta, & Allen, 1979).

Although a number of studies have been published to assess the effect of different factors controlling germination, growth and toxin production by *C. botulinum*, and also their variability, most of the investigations have been carried out under *in vitro* and/or model conditions (Elliott and Schaffner, 2001; Robinson *et al.*, 1982; Stringer *et al.*, 2011). Data from experiments in meat products mainly relate to cooked meats (Hustad *et al.*, 1973; Keto-Timonen *et al.*, 2012), while the studies on dry sausages are

scarce. In relation to previous investigations carried out in Mediterranean type sausages, Nordal and Gudding (1975) inoculated spores of *C. botulinum* types B and E in salami prepared without and with sodium nitrite (200 mg/kg) and evaluated toxin production by assays in mice. These authors did not detect toxin production in any of the sausages, although they stated that the technological benefits of nitrite should be evaluated against the toxicological risk.

Despite no toxin being detected throughout ripening in the conditions and products tested in our study, the importance of nitrite should not be discarded as it may have a relevant role in other products or if other hurdles fail or if ripening conditions varied. The results obtained in this paper highlight the importance of controlling all the technological factors that contribute to inhibit *C. botulinum* in the sausage environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Programme Consolider-Ingenio 2010, Project CSD 2007-00016). The authors also thank Universidad Complutense de Madrid (Group 920276, GR35/10A) for its financial support, and for the predoctoral and short-term grants conceded to X.F. Hospital.

REFERENCES

- Dodds, K. L., 1993. *Clostridium botulinum* in foods. In: Hauschild, A. H. W., Dodds, K. L. (Eds.), *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. Marcel Dekker, New York, pp. 53-68.
- EFSA, 2003. Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the Commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. The EFSA Journal 14, 1-31.
- EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs. The EFSA Journal 199, 1-65.
- Elliott, P. H., Schaffner, D. W., 2001. Germination, growth, and toxin production of nonproteolytic *Clostridium botulinum* as affected by multiple barriers. Journal of Food Science 66, 575-579.
- European Commission, 2011. Commission Regulation (EU) N° 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. Official Journal of the European Union L295, 1-177.
- Ferreira, J. L., Maslanka, S., Johnson, E., Goodnough, M., 2003. Detection of botulin neurotoxins A, B, E, and F by amplified

- enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. *Journal of AOAC International* 86, 314-331.
- Hierro, E., Fernández, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., 2014. *Mediterranean products*. In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, pp. 301-312.
- Hospital, X. F., Hierro, E., Fernández, M., 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International Journal of Food Microbiology* 153, 395-401.
- Hospital, X. F., Hierro, E., Fernández, M., 2014. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella* Typhimurium. *Food Research International* 62, 410-415.
- Hustad, G. O., Cervený, J. G., Trenk, H., Deibel, R. H., Kautter, D. A., Fazio, T., Johnston, R. W., Kolari, O. E., 1973. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. *Applied Microbiology* 26, 22-26.
- ICMSF, 2005. *Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Johnson, E. A., 2013. *Clostridium botulinum*. In: Doyle, M. P., Buchanan, R. L. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, pp. 288-304.
- Keto-Timonen, R., Lindström, M., Puolanne, E., Niemistö, M., Korkeala, H., 2012. Inhibition of toxigenesis of group II (nonproteolytic) *Clostridium botulinum* type B in meat products by using a reduced level of nitrite. *Journal of Food Protection* 75, 1346-1349.
- Lebert, I., Leroy, S., Talon, R., 2007. *Microorganisms in traditional fermented meats*. In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, Blackwell Publishing, Ames, IA, pp. 113-124.
- Leistner, L., 1995. *Stable and safe fermented sausages world-wide*. In: Campbell-Platt, G., Cook, P. E. (Eds.), *Fermented Meats*. Blackie Academic & Professional, London, pp. 160-175.
- Lücke, F. K., 2000. *Fermented meats*. In: Lund, B. M., Baird-Parker, A. C., Gould, G. W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*, vol. I. Aspen, Gaithersburg, MD, pp. 1057-1109.
- Lund, B. M., Graham, A. F., Franklin, J. G., 1987. The effect of acid pH on the probability of growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology* 4, 215-226.
- Lund, B. M., Peck, M. W., 2000. *Clostridium botulinum*. In: Lund, B. M., Baird-Parker, A. C., Gould, G. W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*, vol. I. Aspen, Gaithersburg, MD, pp. 1057-1109.
- Nordal, J., Gudding, R., 1975. The inhibition of *Clostridium botulinum* type B and E in salami sausage. *Acta Veterinaria Scandinavica* 16, 537-548.
- Peck, M. W., 2006. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: An emerging issue? *Journal of Applied Microbiology* 101, 556-570.
- Peck, M. W., 2009. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Advances in Microbial Physiology* 55, 183-265, 320.
- Peck, M. W., Fairbairn, D. A., Lund, B. M., 1992. The effect of recovery medium on the estimated heat-inactivation of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in Applied Microbiology* 15, 146-151.
- Pegg, R. B., Shahidi, F., 2000. *Nitrite Curing of Meat: the N-nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives*. Food & Nutrition Press, Trumbull, CT.
- Robinson, A., Gibson, A. M., Roberts, T. A., 1982. Factors controlling the growth of

- Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats V. Prediction of toxin production: Non-linear effects of storage temperature and salt concentration. *International Journal of Food Science and Technology* 17, 727-744.
- Sebranek, J. G., Bacus, J. N., 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* 77, 136-147.
- Sofos, J. N., Busta, F. F., Allen, C. E., 1979. Sodium nitrite and sorbic acid effects on *Clostridium botulinum* spore germination and total microbial growth in chicken frankfurter emulsions during temperature abuse. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 1103-1109.
- Stringer, S. C., Webb, M. D., Peck, M. W., 2011. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology* 28, 228-235.
- Tompkin, R. B., 2005. Nitrite. In: Davidson, P. M., Sofos, J. N., Branen A. L. (Eds.), *Antimicrobials in Food*. Taylor and Francis, London, 169-236.
- Woods, L. F., Wood, J. M., 1982. A note on the effect of nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. *Journal of Applied Bacteriology* 52, 109-10.

V. Discusión general

V. Discusión general

Un embutido crudo curado es un sistema cárnico complejo en el que distintos factores contribuyen a garantizar la inhibición de microorganismos patógenos y alterantes, permitiendo además el desarrollo de una microbiota deseable desde el punto de vista tecnológico. Aunque la combinación de barreras es una estrategia que hoy en día se aplica intencionadamente en la industria alimentaria, ésta se ha usado de forma tradicional, y con una base empírica, en la elaboración de muchos productos desde tiempos inmemoriales (Daifas *et al.*, 2004; Leistner, 1995).

La estabilidad y seguridad de los embutidos crudos curados se debe a diversos factores, entre los que se encuentran el pH, la a_w , la presencia de una microbiota competitiva, la sal y los nitratos y nitritos. Si bien no resulta fácil establecer la influencia de cada uno de estos factores de forma aislada en el contexto del producto (por la existencia de sinergias, por los cambios que se producen a lo largo del proceso de maduración, o por la gran variedad de embutidos con características muy particulares), parece claro que el pH y la a_w , con límites máximos y mínimos de crecimiento para los distintos microorganismos, son los parámetros más relevantes en los embutidos, ya sea solos o en combinación. La superación de estos valores límite, bien porque el pH y la a_w del embutido sean poco exigentes, bien porque el producto se encuentre en las fases iniciales de maduración, o bien por fallos durante el proceso, hace que otras barreras resulten esenciales; éste puede ser el caso de la adición de conservantes, como los nitratos y nitritos, a la masa cárnica.

Por ello, y paralelamente a los estudios microbiológicos y de compuestos volátiles, en el transcurso de esta Tesis Doctoral se siguió la evolución de los parámetros físicos-químicos en embutidos tradicionales elaborados con distintas concentraciones de sales nitrificantes, para comprobar si su disminución producía alguna modificación en los mismos. Todas las formulaciones mostraron valores de pH, a_w y contenido de humedad típicos de estos productos (Bruna *et al.*, 2001; González-Fernández *et al.*, 2006; Herrero *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 2001; Ordóñez *et al.*, 1999). A continuación se discuten los resultados obtenidos en cada uno de los objetivos planteados en esta Tesis.

Efecto de la disminución de la cantidad añadida de nitratos y nitritos en la microbiota típica de los embutidos.

Las bacterias psicrotrofas son los microorganismos predominantes en las carnes refrigeradas conservadas en aerobiosis (Gill y Newton, 1977). En los ensayos en carne picada realizados en el transcurso de esta Tesis Doctoral se observó que los nitratos y nitritos inhiben el desarrollo de estos microorganismos. Rowe *et al.* (1979) indicaron que el nitrito inhibe el transporte activo, la absorción de oxígeno y la fosforilación oxidativa de *Pseudomonas aeruginosa*, posiblemente por la oxidación del ion hierro en los transportadores de electrones. Otros estudios sugieren que el nitrito también puede inhibir enzimas específicas, como las aldolasas (Yarbrough *et al.*, 1980). Por tanto, en la etapa de reposo previa al embutido, así como en el inicio de la maduración, cuando aún quedan cantidades residuales de oxígeno en la masa y el pH y la a_w son favorables para el crecimiento de los microorganismos psicrotrofos, el nitrito contribuiría eficazmente a su control. En este trabajo se ha observado que la concentración de nitrato/nitrito añadida a la masa se podría reducir hasta en un 25% sin que ello se traduzca en un aumento de los recuentos de bacterias psicrotrofas en el producto.

Una vez que se embute la masa y comienza la maduración, el ambiente interno del embutido favorece el desarrollo de las bacterias lácticas (BAL) que pasan a ser la microbiota dominante. Tanto en los experimentos realizados en carne picada como en embutidos se observó que este grupo microbiano no resulta afectado por la concentración de nitrato/nitrito adicionada a la masa. El patrón de crecimiento de estos microorganismos fue similar en todos los lotes preparados con las diferentes concentraciones de sales nitrificantes ensayadas, así como en su ausencia, en todos los productos que se elaboraron (chorizo, salchichón y fuet) y se mantuvo en el intervalo de valores observados por otros autores (Cocconcelli, 2007; Koutsoumanis *et al.*, 2008; Samelis *et al.*, 1993; Selgas *et al.*, 1988). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Nordal y Gudding (1975) quienes tampoco observaron una inhibición del crecimiento de las BAL en salamis preparados con 200 mg/kg de nitrito y sin nitrito. En estudios en caldo MRS, Korkeala *et al.* (1992) sí observaron inhibición de las BAL, aunque con cantidades mucho más elevadas (400 mg/l de nitrito) que las utilizadas en este trabajo, pero no con 100 mg/l. La mayor resistencia de las BAL al nitrito se

explicaría principalmente por la ausencia de la enzima ferredoxina, que resulta inhibida por este compuesto, y que en otros microorganismos participa en la síntesis de ATP a partir del piruvato (Jay *et al.*, 2005).

Al contrario que en el caso de las BAL, sí se observaron diferencias significativas en los recuentos de cocos Gram-positivos catalasa-positivos (CGC+). Estos microorganismos también forman parte de la microbiota típica deseable desde un punto de vista tecnológico, pues participan en el correcto desarrollo del color y del aroma. A lo largo de la maduración, los recuentos de este grupo microbiano tienden a estabilizarse o disminuir ligeramente debido al descenso del pH y a la baja tensión de oxígeno en el producto (Domínguez *et al.*, 1989; Lücke, 1986). Aunque tanto los niveles iniciales como finales de CGC+ pueden considerarse típicos de los embutidos crudos curados (Cocconcelli, 2007; Domínguez *et al.*, 1989; Lücke, 1986), los lotes con mayores concentraciones de nitrato/nitrito (HN y MN) presentaron menores recuentos, lo que se explicaría por las características de crecimiento de los estafilococos en relación con la tensión de oxígeno y su sistema de reducción del nitrato y el nitrito. Los CGC+ son microorganismos anaerobios facultativos. En ausencia de oxígeno, *Staphylococcus carnosus* utiliza nitrato como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria (Götz *et al.*, 2006), reduciéndolo a nitrito. Una vez el nitrato se agota, este microorganismo reduce el nitrito a amonio para poder seguir multiplicándose (Neubauer y Götz, 1996). A pesar de ello, los estafilococos crecen mucho mejor en presencia de oxígeno, de manera que sus recuentos deberían ser mayores en las zonas más próximas a la tripa que en el centro del producto (Lücke, 1998). Las condiciones de tensión de oxígeno en las capas más externas inhibirían la actividad nitrato/nitrito reductasa de los CGC+ (Neubauer y Götz, 1996), con lo que se acumularían altas concentraciones de nitrito, que en presencia de oxígeno causarían la inhibición del crecimiento mediante distintas interferencias con la cadena respiratoria (Rowe *et al.*, 1979). Por su parte, en el centro del producto, una elevada concentración de nitrato estimularía la actividad reductasa, conduciendo a una acumulación interna de nitrito ya que no podría ser exportado a un ritmo adecuado fuera de la célula (Götz *et al.*, 2006), lo que colaboraría también a inhibir a los estafilococos.

Además de incluir diversas especies patógenas, las enterobacterias constituyen un indicador de las prácticas higiénicas que se han seguido durante los procesos de producción. La contaminación puede producirse bien durante el faenado de la canal, por contacto con el material fecal, o bien durante la elaboración de los productos cárnicos por el uso de utensilios contaminados (Ferreira *et al.*, 2007; Troeger y Wolsterdorf, 1989). Al tratarse de microorganismos muy ubicuos, las enterobacterias siempre se encuentran presentes en la masa cárnica inicial, aunque el procesado se haya realizado en buenas condiciones higiénicas, en cuyo caso estarán presentes en bajas concentraciones. Las enterobacterias son sensibles a valores de pH y a_w bajos y, por lo tanto, sus recuentos tienden a disminuir durante la maduración de los embutidos. No existe una postura unánime sobre el papel de los nitritos en la inhibición de las enterobacterias. En estudios *in vitro*, algunos autores señalan que estos aditivos no tendrían efecto sobre el crecimiento (Gibson y Roberts, 1986), mientras que otros han observado una clara inhibición (Gill y Holley, 2003; Yarbrough *et al.*, 1980). En el presente trabajo se ha observado que la concentración de nitrato/nitrito en el producto fue relevante para el control de este grupo bacteriano. Así se observó que concentraciones de 75 mg/kg permitían un crecimiento moderado de estos microorganismos (no superior a 1 log ufc/g) durante los primeros días del proceso, mientras que niveles de 112,5 y 150 mg/kg causaban su inhibición desde el principio. Por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, antes de que el pH y la a_w sean lo suficientemente desfavorables para las enterobacterias, los nitritos constituirían una barrera eficaz para su control y proporcionarían un producto con menores recuentos finales que cuando se eliminan estos aditivos de la fórmula o su presencia se reduce sustancialmente. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Sanz *et al.* (1997) en embutidos crudos curados y de Nielsen (1983) en mortadela. El efecto inhibitor de los nitritos no sólo sería relevante para el control de microorganismos alterantes, sino también de enterobacterias patógenas, como se tratará a continuación.

Estudio de la seguridad microbiológica de embutidos crudos curados inoculados con microorganismos patógenos y elaborados con distintas concentraciones de nitrato y nitrito.

Salmonella spp. es uno de los principales patógenos que contaminan la carne de cerdo en las líneas de producción. Su crecimiento se inhibe a pH 5,3-5,5 (Chung y Geopfert, 1970; Schillinger y Lücke, 1988), a_w de 0,94 y se hace más lento a temperaturas inferiores a 15 °C (Bell y Kyriakides, 2002). Por lo que se refiere al papel del nitrito, ya se ha mencionado que su efecto inhibitor es controvertido. En los *challenge tests* realizados en este trabajo se observó que los nitritos inhibieron a *Salmonella* Typhimurium, tanto en carne picada como en embutidos. En ambos casos, la menor concentración de nitrato y nitrito ensayada (75 mg/kg de cada uno) inhibió el crecimiento de este microorganismo en comparación con su ausencia en la masa. En los embutidos, la presencia de nitrato/nitrito representó un elemento esencial para el control de *S. Typhimurium* incluso cuando el pH (5,2) y la a_w (<0,94) habían alcanzado valores inferiores a los considerados como mínimos para su multiplicación. Según Schillinger y Lücke (1988), el descenso del pH por debajo de 5,3 debería ser suficiente para inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp. en el entorno de un embutido. Adicionalmente, a medida que el pH se aproxima a los valores mínimos, *Salmonella* spp. requiere mayor a_w para su crecimiento (Jay *et al.*, 2005), con lo que la disminución gradual de la a_w contribuiría al efecto inhibitor del pH. Por otra parte, se ha descrito que la mayor actividad antimicrobiana del nitrito se produce a valores de pH entre los que se encuentran los típicos de los embutidos mediterráneos. Dicha actividad está relacionada con el ácido nitroso no disociado (Castellani y Niven, 1955; Freese *et al.*, 1973). Debido al pKa del nitrito (3,29), el pH en el que la mayor parte del ácido nitroso se encuentra en estado no disociado y, consecuentemente, presenta la mayor actividad antimicrobiana, está comprendido entre 4,5 y 5,5 (Jay *et al.*, 2005).

Durante el secado de los embutidos, y tal y como se ha descrito anteriormente, las enterobacterias disminuyen lentamente por efecto de la acidez, el descenso de la a_w y la presencia de nitrito. Sin embargo, si durante la fermentación las condiciones del producto permiten su crecimiento y no se adiciona nitrito a la fórmula, la posterior disminución de los recuentos de *Salmonella* spp. a lo largo de la maduración y el

almacenamiento puede no ser suficiente para garantizar su seguridad. En este sentido, se han descrito diversos casos de salmonelosis debidos al consumo de embutidos fermentados en los que se produjo el crecimiento de *Salmonella* spp. durante la fermentación (Cowden *et al.*, 1989; Marazza y Crespi, 1963; Pontello *et al.*, 1998) y en los que su posterior inhibición no fue suficiente para evitar la presencia de dosis infectivas en el producto final. Entre las causas de este comportamiento estarían una insuficiente acidificación durante la fermentación, un tiempo de maduración demasiado corto y/o el empleo de bajas concentraciones de nitrato/nitrito en la formulación (Leistner *et al.*, 1982; Lücke, 2000; Pontello *et al.*, 1998).

Por otra parte, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral evidenciaron que los nitratos y nitritos desempeñan un importante papel en la inhibición de *Listeria* durante la maduración de los embutidos fermentados. El efecto inhibitor del nitrito en este microorganismo había sido descrito con anterioridad en ensayos *in vitro* (Shahmat *et al.*, 1980), pero no en productos cárnicos curados. En este trabajo se ha observado que *Listeria* puede multiplicarse en la masa recién embutida en ausencia de nitrito, aunque después, el descenso del pH y la a_w resulten desfavorables para su crecimiento. Se consideran valores mínimos la combinación de $\text{pH} < 5,0$ y $a_w < 0,94$ (Farber y Peterkin, 1991; Nolan *et al.*, 1992). Independientemente de la concentración empleada, la presencia de nitrato y nitrito en la masa produjo una inhibición de *Listeria* desde el comienzo del proceso y su efecto se evidenció incluso cuando las condiciones de pH y a_w ya no eran favorables para el microorganismo, pues los recuentos finales fueron considerablemente menores en el lote elaborado con 150 mg/kg (HN), en comparación no sólo con el control sino también con los lotes MN y LN. Así pues, en las condiciones ensayadas en esta Tesis, la diferencia de 2 log ufc/g observada entre los embutidos HN en comparación con el lote preparado sin nitrato/nitrito y de 1,5 log ufc/g con los lotes reducidos, hace pensar que en caso de que se rebajaran las cantidades actualmente permitidas por la UE, se comprometería la seguridad de los embutidos de tipo mediterráneo con respecto a *Listeria*.

Tradicionalmente se ha considerado que los nitritos inhiben la germinación de las esporas de *C. botulinum* y la consecutiva producción de toxina en los embutidos crudos curados. De acuerdo con la EFSA (2003), la adición de estos conservantes

resultaría necesaria para el control de *C. botulinum* en la mayoría de los productos cárnicos curados, aunque no existe una postura unánime al respecto. En principio, con la implantación de los sistemas APPCC, unas buenas prácticas higiénicas, el uso de tiempos cortos de maduración y un adecuado control de la temperatura se podrían producir embutidos con menos nitritos o incluso sin ellos. No obstante, en la mayoría de los casos, y especialmente en embutidos con un bajo contenido de sal y con una maduración prolongada, se considera necesario añadir entre 50 y 150 mg/kg de nitrito para inhibir a *C. botulinum* (EFSA, 2003).

Dadas las dificultades que plantean los ensayos en productos reales, la mayor parte de los resultados publicados hasta la fecha sobre el papel de los nitritos en *C. botulinum* se refieren a investigaciones *in vitro* o en sistemas modelo (Elliott y Schaffner, 2001; Robinson *et al.*, 1982; Stringer *et al.*, 2011), por lo que resulta de gran interés la realización de ensayos de inoculación en producto. La ausencia de toxina botulínica en todas las muestras de salchichón y fuet analizadas en esta Tesis, incluso en los lotes sin nitrato/nitrito añadido, indicaría que barreras como el pH, la a_w , la presencia de una microbiota competitiva y la temperatura, habrían actuado conjuntamente de forma eficaz controlando la germinación y el crecimiento de *C. botulinum* independientemente de la concentración de nitrito añadida. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de controlar todos los factores tecnológicos durante la maduración, aunque el papel del nitrito no se debería descartar en caso de que falle alguna de las barreras, se utilicen otras condiciones de maduración o se incluya alguna modificación en la composición del embutido, como por ejemplo una disminución del contenido de sal.

Efecto de la concentración de nitratos y nitritos en la fracción volátil de embutidos crudos curados elaborados con distintas concentraciones de sales nitrificantes.

Como se ha mencionado, la concentración de nitratos y nitritos afectó significativamente a los niveles de CGC+, grupo microbiano que forma parte de la microbiota típica de los embutidos y al que se atribuye la producción de algunos compuestos volátiles que participan en el aroma típico de estos productos.

En el análisis de compuestos volátiles no se observaron diferencias cualitativas debidas a la concentración añadida de nitrato/nitrito, registrándose el perfil cromatográfico típico del salchichón y el chorizo (Ansorena *et al.*, 2001; Marco *et al.*, 2004; Mateo y Zumalacárregui, 1996; Olivares *et al.*, 2011). Por el contrario, sí se observaron diferencias cuantitativas relacionadas principalmente con el contenido de sustancias volátiles derivadas de la fermentación de los carbohidratos y de la degradación de los aminoácidos, que fue superior en los lotes con menor concentración de nitrato/nitrito y, consecuentemente, mayores recuentos de CGC+. Así, cuanto menor fue la concentración añadida a la fórmula, mayores niveles de ácido acético, acetoína y diacetilo se detectaron (todos ellos procedentes de los carbohidratos), así como de ciertos aldehídos, alcoholes y ácidos ramificados (derivados del catabolismo de los aminoácidos), a los que se ha atribuido el aroma a “maduro” de los productos cárnicos curados (Ruiz *et al.*, 1999; Stahnke *et al.*, 1999).

Otra de las funciones que se atribuyen a los nitratos y nitritos en los productos cárnicos es su papel antioxidante. Por lo tanto, cabría esperar que una disminución de su concentración en la fórmula se tradujera en un aumento de los compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica, que, en cantidades adecuadas, son esenciales para el desarrollo del sabor y aroma de los productos curados (Marco *et al.*, 2007; Ordóñez *et al.*, 1999; Shahidi *et al.*, 1986). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, únicamente se observó un incremento de los compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica en los embutidos elaborados sin nitrato/nitrito y todas las concentraciones de estos aditivos utilizadas para preparar el resto de los lotes modularon en la misma medida la oxidación de la fracción lipídica.

En el marco del proyecto CARNISENUSA, el grupo del Centro Tecnológico AINIA (Valencia) responsable del análisis sensorial de los productos elaborados (Acción 7 del subproyecto NITRARED), no observó diferencias significativas entre las distintas concentraciones de nitrificantes añadidas, aunque sí se comprobó que la total eliminación de estos aditivos en la fórmula no resultaría viable desde el punto de vista organoléptico (Lorente *et al.*, 2011). Por lo tanto, en relación con la calidad sensorial, los resultados obtenidos parecen indicar que sería posible reducir la concentración

máxima permitida de nitrato/nitrito en los embutidos crudos curados, al menos en un 50%.

Referencias

- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I., y Bello, J. (2001). Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry-fermented sausage: Chorizo de Pamplona. *Food Research International*, 34, 67-75.
- Bell, C., y Kyriakides, A. (2002). *Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods*. Oxford: Blackwell Science.
- Bruna, J. M., Hierro, E. M., De La Hoz, L., Mottram, D. S., Fernández, M., y Ordóñez, J. A. (2001). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 59, 97-107.
- Castellani, A. G., y Niven, C. F. (1955). Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. *Applied Microbiology*, 3, 154-159.
- Chung, K. C., y Geopfert, J. M. (1970). Growth of *Salmonella* at low pH. *Journal of Food Science*, 35, 326-328.
- Cocconcelli, P. S. (2007). Starter cultures: bacteria. En F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 140-146). Ames: Blackwell Publishing.
- Cowden, J. M., O'Mahony, M., Bartlett, C. L. R., Rana, B., Smyth, B., Lynch, D., et al. (1989). A national outbreak of *Salmonella typhimurium* DT124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiology and Infection*, 103, 219-225.
- Daifas, D. P., Smith, J. P., Blanchfield, B., Sanders, G., Austin, J. W., y Koukoutsis, J. (2004). Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 313-322.
- Domínguez, M. C., Gutiérrez, L. M., López, A., Seco, F., y Zumalacárregui, J. M. (1989). Development of the principal groups of microorganisms during the ripening of chorizo sausage from León. *Alimentaria*, 26, 11-15.
- EFSA. (2003). Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the Commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *The EFSA Journal*, 14, 1-31.
- Elliott, P. H., y Schaffner, D. W. (2001). Germination, growth, and toxin production of nonproteolytic *Clostridium botulinum* as affected by multiple barriers. *Journal of Food Science*, 66, 575-579.
- Farber, J. M., y Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., et al. (2007). Chemical and microbiological characterisation of «Salpicão de Vinhais» and «Chouriça de Vinhais»: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food Microbiology*, 24, 618-623.
- Freese, E., Sheu, C. W., y Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321-325.
- Gibson, A. M., y Roberts, T. A. (1986). The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonellae* in a laboratory medium. *International Journal of Food Microbiology*, 3, 183-194.
- Gill, A. O., y Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride

- at 24°C. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 251-259.
- Gill, C. O., y Newton, K. G. (1977). The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 43, 189-195.
- González-Fernández, C., Santos, E. M., Rovira, J., y Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74, 467-475.
- Götz, F., Bannerman, T., y Schleifer, K. H. (2006). The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. En M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes* (pp. 5-75). Nueva York: Springer Science.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., de Avila, R., Herranz, B., de la Hoz, L., y Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physicochemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331-338.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., y Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7ª ed.). Nueva York: Springer Science.
- Korkeala, H., Alanko, T., y Tiusanen, T. (1992). Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33, 27-32.
- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., y Nychas, G. J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25, 915-921.
- Leistner, L. (1995). Stable and safe fermented sausages world-wide. En G. Campbell-Platt y P. E. Cook (Eds.), *Fermented meats* (pp. 160-175). Londres: Blackie Academic & Professional.
- Leistner, L., Hechelmann, H., y Lücke, F. K. (1982). Auswirkungen der neuen Nitrit-VO in der Mikrobiologie. *Kulmbach: Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung*, 76, 5001-5005.
- Lorente, M., Villegas, B., y Sánchez, M. J. (2011). Efecto de la reducción de la concentración de nitratos y nitritos en la calidad sensorial de productos cárnicos crudo-curados. *Eurocarne*, 194, 74-79.
- Lücke, F. K. (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausages and raw ham. *Fleischwirtschaft*, 66, 1505-1509.
- Lücke, F. K. (1998). Fermented sausages. En B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods* (pp. 441-483). Londres: Blackie Academic & Professional.
- Lücke, F. K. (2000). Fermented meats. En B. Lund, T. C. Baird-Parker, y G. W. Gould (Eds.), *Microbiological safety and quality of food. Vol. 1* (pp. 420-444). Gaithersburg, Meriland: Aspen.
- Marazza, V., y Crespi, C. (1963). Osservazioni sulla sopravvivenza di *Salmonella choleraesuis* in insaccati naturalmente inquinati. *Atti della Società Italiana di Scienze Veterinarie*, 17, 537-541.
- Marco, A., Navarro, J. L., y Flores, M. (2004). Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase micro-extraction (SPME). *Food Chemistry*, 84, 633-641.
- Marco, A., Navarro, J. L., y Flores, M. (2007). Quantification of selected odor-active constituents in dry fermented sausages prepared with different curing salts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3058-3065.
- Mateo, J., y Zumalacárregui, J. M. (1996). Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Science*, 44, 255-273.
- Mendoza, E., García, M. L., Casas, C., y Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science*, 57, 387-393.
- Neubauer, H., y Götz, F. (1996). Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*, 178, 2005-2009.

- Nielsen, H. J. S. (1983). Composition of bacterial flora in sliced vacuum packed Bologna-type sausage as influenced by nitrite. *International Journal of Food Science & Technology*, 18, 371-385.
- Nolan, D. A., Chamblin, D. C., y Troller, J. A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 323-335.
- Nordal, J., y Gudding, R. (1975). The inhibition of *Clostridium botulinum* type B and E in salami sausage. *Acta veterinaria Scandinavica*, 16, 537-548.
- Olivares, A., Navarro, J. L., y Flores, M. (2011). Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages. *Meat Science*, 87, 264-273.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., y De la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical reviews in food science and nutrition*, 39, 329-367.
- Pontello, M., Dodano, L., Nastasi, A., y Mammina, C. (1998). A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy. *Epidemiology and Infection*, 120, 209-214.
- Robinson, A., Gibson, A. M., y Roberts, T. A. (1982). Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats V. Prediction of toxin production: Non-linear effects of storage temperature and salt concentration. *International Journal of Food Science & Technology*, 17, 727-744.
- Rowe, J. J., Yarbrough, J. M., Rake, J. B., y Eagon, R. G. (1979). Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, 2, 51-54.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., y García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, 19-27.
- Samelis, J., Aggelis, G., y Metaxopoulos, J. (1993). Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. *Meat Science*, 35, 371-385.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., Nieto, P., y Flores, J. (1997). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 225-259.
- Schillinger, U., y Lücke, F. K. (1988). Hemmung des Salmonellenwachstums in frischer, streichfähiger Mettwurst ohne Zuckerstoffe. *Fleishwirtschaft*, 68, 1056-1067.
- Selgas, M. D., Sanz, B., y Ordóñez, J. A. (1988). Selected characteristics of *Micrococci* isolated from Spanish dry fermented sausages. *Food Microbiology*, 5, 185-194.
- Shahidi, F., Rubin, L. J., y D'Souza, L. A. (1986). Meat flavor volatiles - a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 141-143.
- Shahmat, M., Seaman, A., y Woodbine, M. (1980). Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *L. monocytogenes*. En G. W. Gould y J. E. J. Corry (Eds.), *Microbial growth and survival in extremes of environment* (pp. 227-237). Nueva York: Academic Press.
- Stahnke, L. H., Friis, L., Martinussen, J., Thomsen, L. E., Jessen, B., Stolpe, E., et al. (1999). *Aroma development in fermented meat products - Staphylococcus's degradation of amino acids in relation to aroma formation, final report of a FØTEK 2 collaboration project*. Dinamarca: The Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.
- Stringer, S. C., Webb, M. D., y Peck, M. W. (2011). Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology*, 28, 228-235.
- Troeger, K., y Wolsterdorf, W. (1989). Contaminación microbiana de canales de porcino

por el agua de escaldado a través del sistema vascular. *Fleischwirtschaft Español*, 1, 13-18.

Yarbrough, J. M., Rake, J. B., y Eagon, R. G. (1980). Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 831-834.

VI. Conclusiones / Conclusions

VI. Conclusiones

Primera. Los nitratos y nitritos influyen en la ecología microbiana ligada a la calidad y seguridad de los embutidos crudos curados.

Segunda. Si se disminuye la concentración de nitratos y nitritos en un 25% o más, respecto de las cantidades máximas actualmente permitidas en la UE, se incrementan los recuentos de cocos Gram-positivos catalasa-positivos, lo que se traduce en un aumento de los compuestos volátiles procedentes de la fermentación de los carbohidratos y del catabolismo de los aminoácidos.

Tercera. Una reducción igual o superior al 25% de la concentración de nitratos y nitritos supone la presencia de mayores niveles de enterobacterias en el producto final, en comparación con la utilización de las cantidades máximas actualmente permitidas.

Cuarta. Los nitratos y nitritos constituyen una barrera para el control de *Salmonella* en las primeras etapas de la maduración de los embutidos, si bien un 50% de la cantidad máxima actualmente permitida proporcionaría el mismo nivel de protección frente a este patógeno.

Quinta. Los nitratos y nitritos ejercen un notable efecto inhibitor frente a *Listeria* en los embutidos. En el caso de que este microorganismo se encontrara en la masa cárnica, sus recuentos en el producto final serían del orden de 1,5 log ufc/g mayores con tan solo una reducción del 25% de la cantidad máxima permitida.

Sexta. La disminución, e incluso la eliminación de los nitratos y nitritos en la fórmula, no parece influir en la producción de toxina por *Clostridium botulinum* en los embutidos.

Séptima. La utilización de nitratos y nitritos en la industria cárnica ofrece ventajas desde el punto de vista higiénico que deben analizarse en el contexto del balance riesgo-beneficio en contraposición con sus posibles efectos toxicológicos.

Conclusions

First. Nitrate and nitrite affect the microbial ecology linked to the quality and safety of dry fermented sausages.

Second. A 25% reduction of the maximum amount of nitrate and nitrite currently allowed by the EU regulations results in increased numbers of Gram-positive catalase-positive cocci and a consequent rise of volatile compounds derived from carbohydrate fermentation and amino acid catabolism.

Third. A 25% reduction of the concentration of nitrate and nitrite leads to the presence of higher counts of *Enterobacteriaceae* in the final product when compared with the use of the maximum amounts currently allowed.

Fourth. Nitrate and nitrite constitute a hurdle for the control of *Salmonella* during in the early stages of the ripening of dry fermented sausages, although a 50% reduction of the maximum amount currently allowed would provide the same level of protection against this pathogen.

Fifth. *Listeria* is significantly inhibited by nitrate and nitrite in dry fermented sausages. If this organism contaminated the meat batter, its numbers in the final product would be approximately 1.5 log cfu/g higher with only a 25% reduction of the maximum amount currently allowed.

Sixth. Reducing or even removing nitrate and nitrite in the formula does not appear to influence the production of neurotoxin by *Clostridium botulinum* in dry fermented sausages.

Seventh. The use of nitrate and nitrite in the meat industry offers advantages from a hygienic point of view that should be evaluated in the context of a risk-benefit balance against their possible toxicological effects.